



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

47^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8^o Núcleo de Gestão e Qualidade | 6^o Fórum de Proprietário de Laboratórios

Centro de Eventos do Ceará - Fortaleza/CE

19 a 22
de Junho/2022

**Nosso congresso presencial está confirmado!
Estamos preparando muitas atividades e
ansiosos por nosso reencontro.**

**As inscrições
já estão abertas!**

Acesse:
cbac.org.br



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

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

Editores Associados/Associate Editors
Lenilza Mattos Lima (SC)
Mauren Isfer Anghebem (PR)



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 53 - Número 3 - 2021
Edição online - ISSN 2448-3877

Produção Editorial/Publisher
Editorarte Projetos de Comunicação e Editora Ltda.



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/Assistant Treasurer

Conselho Fiscal/Fiscal Board Titulares/Holderes

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
E-mail: rbac@sbac.org.br

Afiliações/Affiliations



Comitê Editorial/Editorial Board

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Paolo Mocarelli (ITA), Dulcinea 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 Cytology

André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), 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), 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

Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem (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 Hirokyu Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávila 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 Accreditation
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 Commissions

Coordenador Geral/General Coordinator
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissão de Congressos/Congress Commission
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:
Mauren Isfer Anghebem (PR)
Membros/Members: Luiz Fernando Barcelos (RS)

Ensino/Education
Paulo Murillo Neufeld (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ)

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

Sumário/Contents

EDITORIAL / EDITORIAL

- 201** Personagem da História da Saúde XII: Edward Jenner e a origem das vacinas
Personalities of Health History XII: Edward Jenner and the origin of the vaccines
Neufeld PM

ARTIGOS DE REVISÃO / REVIEW

- 211** Leptospirose: Características da enfermidade em humanos e principais técnicas de diagnóstico laboratorial
Leptospirosis: Characteristics of the human disease and main laboratory diagnostic techniques
Ramos TMV, Balassiano IT, Silva TSM, Nogueira JMR
- 219** Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos
Bacterial resistance to antimicrobials: a review of the main species involved in infectious processes
Abrantes JA, Nogueira JMR
- 224** Controle da qualidade em Citopatologia: A importância da fase pré-analítica
Quality control in Cytopathology: The importance of the pre-analytical phase
Alencar GF, Araujo IMC, Costa LVG, Trajano NB, Utagawa ML
- 228** Expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 na lesão intraepitelial cervical de alto grau: revisão de estudos
Immunohistochemical expression of biomarkers p16 and Ki-67 in high-grade cervical intraepithelial lesion: review of studies
Melo CAF, Utagawa ML

ARTIGOS DE ATUALIZAÇÃO / UPDATE

- 232** Avanços e perspectivas no diagnóstico molecular da leucemia mieloide aguda: revisão sistemática
Advances and perspectives in the molecular diagnosis of acute myeloid leukemia: systematic review
Silva FM, Conceição RR
- 239** Importância do diagnóstico precoce da *Chlamydia trachomatis*
Importance of early diagnosis of Chlamydia trachomatis
Utagawa ML, Araujo IMC

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 245** Análise qualitativa do teste de fragilidade osmótica para amostras processadas a fresco ou após 24 horas de incubação a 37°C
Qualitative analysis of the osmotic fragility test for samples processed fresh or after 24 hours of incubation at 37°C
Quadros AO, Brito Junior LC

Sumário/Contents

- 252** Prevalência de bastonetes Gram-negativos não fermentadores isolados em amostras de hemoculturas
Prevalence of non-fermenter Gram-negative bacilli isolated in blood culture samples
Leal MS, Carneiro AA, Garcia PG
- 258** Correlação entre os métodos sorológico e molecular para detecção do HIV na triagem de doadores de sangue na Fundação HEMOPA
Correlation between serological and molecular methods for HIV detection in blood donor screening in HEMOPA Foundation
Amaral CEM, Cunha LRM, Macedo VL
- 264** Incidência de *Streptococcus* β -Hemolítico em Gestantes do Município de Campinas, São Paulo
 β -hemolytic Streptococcus incidence in pregnant women of Campinas Municipality, São Paulo
Fedozzi MM, Almeida JFM
- 271** Avaliação da qualidade na gestão de estoque em laboratório clínico no município de Fortaleza, Ceará
Quality assessment in stock management in a clinical laboratory in Fortaleza Municipality, Ceará
Mourão CI, Ielpo AFP
- 277** Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de um hospital público de Aracaju, Sergipe
Antimicrobial sensitivity profile analysis of a public hospital in Aracaju, Sergipe
Almeida HF, Silva RO, Almeida MB, Almeida F, Menezes JS, Dias TAP
- 285** Avaliação dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência humana
Evaluation of rapid test parameters for the human immunodeficiency virus diagnosis
Scherdien RA, Silva CL, Grando AC
- 293** Hipossuficiência de vitamina D em pacientes atendidos em um laboratório de análises clínicas de Salvador, Bahia
Vitamin D hypo-sufficiency in patients attended in a clinical analysis laboratory in Salvador city, Bahia
Novais LRS, Oliveira KF, Silva AR, Lima MVA
- 299** Perfil de suscetibilidade antimicrobiana em infecções do sítio cirúrgico em um hospital público de traumatologia ortopedia no Nordeste do Brasil
Antimicrobial susceptibility profile in surgical site infections in the trauma and orthopedic service of a public hospital in the Brazilian Northeast region
Santos JF, Silva JCG, Vasconcelos MARA, Hinrichsen SML

COMUNICAÇÃO BREVE / SHORT COMMUNICATION

- 307** Análise microbiológica de morangos frescos comercializados em Goiânia, Goiás
Microbiological analysis of fresh strawberries commercialized in Goiânia, Goiás
Araújo VKMN, Estephan ED, Cardoso AM

Sumário/Contents

NOTA TÉCNICA / TECHNICAL NOTES

- 311** A importância da liberação da estimativa da taxa de filtração glomerular junto do resultado da creatinina sérica nos laudos
The importance of the glomerular filtration rate estimation combines with the serum creatinine result in the reports
Martinello F, Lima LM, Anghebem MI
- 316** Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas sobre o reporte da estrutura denominada *Urbanorum* spp. em amostras de fezes - 2021
Position of the Brazilian Society of Clinical Analyses on the report of the structure called Urbanorum spp. in stool samples - 2021
Poloni JAT, Silveira ACO, Martinello F, Anghebem MI, Neufeld PM, Tasca T, Lima LM

320 **CARTA AO EDITOR / LETTER TO EDITOR**

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

Personagem da História da Saúde XII: Edward Jenner e a origem das vacinas

Personalities of Health History XII: Edward Jenner and the origin of the vaccines



Um dos capítulos mais brilhantes da história da medicina é o impacto das vacinas na longevidade e na manutenção da saúde pública. Mais de 300 anos se passaram desde que a primeira vacina foi descoberta e essa verdade, qual seja, o impacto positivo na saúde pública, continua sendo socialmente considerada, apesar da intensa discussão que tem sido travada na atualidade sobre a eventual crença ou descrença popular acerca da efetividade desses imunobiológicos na proteção da saúde humana, o que tem alimentado os movimentos contemporâneos contra as vacinas e os programas de vacinação.

Na realidade, as vacinas sempre tiveram um percurso extremamente acidentado, controverso e com muitas dificuldades de aceitação, desenvolvimento e operacionalização. No final do século XVIII, com análises empíricas e observações ocorrendo num ambiente sem nenhuma lógica imunitária factual acerca da fisiopatologia e da clínica da varíola, vacinas e vacinações tiveram seu início no ocidente. A partir do final do século XIX, contudo, o estudo das vacinas começou a ser tratado de maneira mais metódica com a introdução da ciência e das pesquisas em laboratório, principalmente, na França, por Louis Pasteur. Em decorrência disso, no século XX, o empirismo foi sendo aos poucos contornado pela progressiva compreensão sobre os componentes e a função do sistema imunitário na defesa dos hospedeiros, o que levou os pesquisadores a fazerem escolhas e tomarem decisões racionais baseadas em evidências científicas, permitindo, assim, o desenvolvimento das primeiras vacinas fundadas em marcadores imunológicos. No século XXI, tendo em vista o conhecimento acumulado sobre biologia molecular e engenharia genética, a investigação molecular foi incorporada à tecnologia de produção das vacinas, possibilitando maior estabilidade, resposta imune de amplo espectro e de longa duração, utilização de vários genes simultaneamente, busca e seleção de candidatos a novas vacinas, efeito adjuvante, baixo risco infeccioso, fácil produção e menor custo.

Voltando ao início da história com a varíola, peça importante no enredo vacinal, descrições dessa doença aparecem em escritos médicos da antiguidade no Egito dos faraóis, Índia e China. De acordo com os relatos arqueológicos, possivelmente, o primeiro paciente “conhecido” a morrer de varíola foi o faraó Ramsés IV que, com a idade de 40 anos, faleceu no ano de 1157 aC pela enfermidade. Pústulas de 1-5 mm de diâmetro foram identificadas em sua múmia, nas regiões da face, pescoço, ombros, braços, abdômen e escroto.

O Império Romano, por sua vez, com ampla extensão territorial devido a anexações de provinciais em decorrência de inúmeras guerras, grande densidade demográfica, cidades com infraestrutura precária, agricultura e comércio pujantes e grandes áreas de livre circulação de pessoas e mercadorias era propício à propagação de epidemias e pandemias. Na verdade, em 165 dC, Roma experimentou uma pandemia de varíola sem precedentes, que atingiu todas as províncias do Império e que ficou conhecida como a Peste Antonina. Considera-se que a peste tenha vindo do oriente, se espalhando pelo Egito, oriente médio e Ásia Menor, através do Mar Vermelho. A varíola se disseminou ainda pela Síria, Caldéia, Mesopotâmia, Líbia e Cilícia. Em 166 dC, o co-imperador Lúcio

Vero faleceu em Roma. A peste se espalhou de leste a oeste pela Europa ocidental até 172dC, com uma taxa de mortalidade de 15-20%. Uma segunda onda atingiu Roma em 191 dC, exibindo um percentual de mortalidade de 30-50%. Estima-se um número de 7-8 milhões de mortes em todo o Império Romano, sendo os mais afetados crianças e jovens adultos de regiões costeiras expostas ao comércio marítimo. Apesar da varíola ser desconhecida de Hipócrates, Galeno foi testemunha ocular da epidemia em Roma, inclusive, descrevendo pormenorizadamente a sintomatologia da doença. Ao bispo da localidade francesa de Avenches, conhecido como Marius, é atribuído a criação, em 570, da palavra “varíola”, cujo significado é pintado ou pontilhado.

A varíola se estabeleceu em todo o mundo cristão, a partir do século VI, principalmente pelo fato de, nessa época, já ser epidêmica na região asiática. Por isso, a doença chegou à África, à Espanha e depois ao resto da Europa, durante a conquista mulçumana de Trípoli, em 647, a invasão da Andaluzia, em 710, e a invasão da Gália, em 731. A doença se manteve endêmica na Europa desde a Idade Média até a sua erradicação em 1977. Tipicamente, exibia uma evolução sazonal nas cidades, acometendo, de forma grave, crianças durante o inverno.

A doença foi ainda descrita por um médico copta conhecido como Aaron de Alexandria, no século VII, bem como em textos indianos do início do século VIII. Em 910 dC, um médico persa chamado Rhazes forneceu descrições notáveis sobre a varíola, inclusive, com diagnóstico diferencial entre essa virose e o sarampo. Avicena, no século XI, e Ibn Khatib, no século XII, informaram sobre a grande infectividade da doença e sobre os seus métodos de prevenção e controle.

Importa mencionar que a endemia da virose no continente europeu foi decorrente do grande crescimento demográfico e da enorme expansão das cidades à época, o que desencadeou um vertiginoso aumento do número de casos e determinou a permanência da varíola na população. Como ilustração, em 1750, a Europa tinha 140 milhões de habitantes e, em 1845, passou a ter 250 milhões. Na segunda metade do século XVII, as taxas de mortalidade europeias eram em torno de 15% e, no final do século XVIII, atingiram, nas áreas urbanas, percentuais de 20%-50%, em adultos, e de 33%, em crianças. Nos anos de 1800, cerca de 400.000 pessoas morriam anualmente na Europa e, as que sobreviviam, frequentemente, apresentavam sequelas como cegueira e cicatrizes.

A despeito da disseminação da doença pela Europa, no Reino Unido, a varíola foi especialmente agressiva. No período entre os séculos XVIII e XIX, a virose era endêmica em todas as cidades das ilhas britânicas e Irlanda, se constituído numa contínua ameaça à saúde pública. O temor da varíola determinou a busca dos pesquisadores daquele país por proteção, o que fomentou a união de ideias médicas e teúrgicas.

No tocante à medicina, médicos ingleses procuraram determinar a origem da doença e estabelecer medidas de prevenção efetivas. Nesse sentido, uma concepção sobre as causas da varíola foi desenvolvida em sintonia com a teoria dos miasmas, atribuindo às mudanças atmosféricas o caráter epidêmico da doença. Ao mesmo tempo, protocolos terapêuticos como o chamado “tratamento refrescante”, onde o paciente era retirado da cama, vestido com uma simples camisola e induzido a caminhar descalço em um quarto ensolarado e exposto a correntes de ar e a ingerir chás frios de ervas com menta, água de cevada, leite aguado e medicação emética, além de ser submetido a sangrias, foram propostos e amplamente empregados. No entanto, foi a descoberta das vacinas o que determinou, de fato, o controle e a proteção frente à infecção viral.

Apesar da descoberta da vacina ser atribuída ao médico Edward Jenner, práticas vacinais já eram conhecidas antes do trabalho desse médico inglês. Na verdade, ele recebeu todos os créditos científicos pela falta de publicação com rigor metodológico dos procedimentos realizados anteriormente às suas pesquisas. Em suas publicações, Jenner demonstrou a capacidade protetora de seus experimentos frente à varíola, o que foi considerado a primeira prova de imunidade conferida por uma vacina.

Na verdade, antes de Jenner, a imunização contra a varíola ou variolização já era mencionada em antigos textos sânscritos do livro ayurvédico *Sact'eya Grantham*, datado

de 1000 aC. A revelação sobre a existência desses textos e do processo de variolização foi feita pelo cirurgião Irlandês John Zephaniah Holwell (1711-1798), funcionário da Companhia das Índias Orientais e Governador Temporário de Bengala, que descreveu a prática da variolização contida no livro *védico*, em 1767.

Os chineses eram também outro povo que já conhecia a prática da variolização, desde o século VI aC como informado pelo historiador grego Tucídides ainda no século V aC. Indícios da prática de variolização aparecem no século X como relatado pelo escritor Zhu Yiliang, em 1808. Uma outra evidência escrita dessa prática foi feita no século XI por uma monja budista em seu livro *“O tratamento adequado da Variola”*. Um antigo livro do serviço médico imperial da Dinastia Qing (1644-1912) intitulado *“O espelho dourado da medicina”*, igualmente, relacionava as diversas formas de variolização. Outros autores chineses também documentaram, em diferentes textos, os procedimentos de variolização, entre eles, Wan Quan, em 1549, Wang Zhangren, em 1579, Yu Chang, em 1643, Zhang Lu, em 1695, Yu Tianchi, em 1727, e Zhang Yan, em 1741.

Na região da Circássia, no norte do Cáucaso, a variolização era também uma prática há muito tempo conhecida e, no século XVII, chegou à Istambul, Turquia, através da entrada de mulheres circassianas que eram requisitadas pelos sultões para fazerem parte de seus haréns. Essas mulheres tinham o costume de fazer a variolização em seus filhos pequenos para imunizá-los e esse procedimento, aos poucos, foi sendo copiado pela comunidade médica turca e a sociedade local. Interessante notar que a variolização chegou até a Ásia Central vindo do antigo império chinês, através da rota da seda, que foi utilizada entre o século II aC e o século XVI.

Um explorador inglês da Abissínia (Etiópia) chamado Nathaniel Pearce, em 1831, relatou que a variolização era historicamente conhecida e praticada pelos povos Amhara e Tigray que habitavam aquela região africana. Além disso, desde o século XVIII, se conhecia que o povo Ga-Adangbe de Accra, em Gana, também praticava há muitos anos essa forma de imunização.

Na Europa, o conhecimento sobre a variolização chegou a partir da publicação, na *Philosophical Transactionas of the Royal Society*, de um relatório que continha informações sobre o assunto, pelo médico inglês John Woodward, em 1714, e que fora enviado a ele por dois médicos otomanos de origem grega e italiana, Emmanuel Timonius e Giacomo Pilarino, que atuavam em Constantinopla. A divulgação e a popularização do método na Inglaterra, contudo, veio através de lady Mary Wortley Montagu, esposa do embaixador inglês em Istambul que, na juventude, após perder o irmão e contrair variola, o que a deixou desfigurada, ao entrar em contato com a variolização na Turquia, decidiu fazer o procedimento em seus filhos e, no retorno à Inglaterra, em 1721, convenceu os nobres a também se imunizarem, após experiências bem-sucedidas com prisioneiros ingleses. O cirurgião e farmacêutico Robert Sutton, ao modificar, em 1767, a metodologia de preparo dos pacientes para o procedimento, diminuiu o risco e facilitou a aplicação da vacina, o que permitiu que um grande contingente de indivíduos fosse vacinado, se transformando, inclusive, num bom negócio para a família Sutton.

Até 1750, no entanto, a variolização permaneceu adormecida na Inglaterra e Europa. Em muitos países foi recebida com relutância pelo desconhecimento, religião, misticismo, folclore e, posteriormente, pelos casos reais de adoecimento e morte de alguns variolizados. A primeira inoculação na França foi realizada, em 1754, em uma criança de 4 anos. Aos poucos, todavia, a nobreza e a realeza francesas decidiram se submeter à variolização. Na Áustria, a imperatriz Maria Teresa teve seus dois filhos e as arquiduchessas Teresa e Maria Antonieta, futura rainha da França, variolizadas, em 1768. No mesmo ano, a Czarina da Rússia, Catarina II, decidiu se imunizar. A nobreza alemã também aceitou ser imunizada. A prática da variolização se espalhou lentamente entre as famílias reais europeias, geralmente, também seguida da adoção da prática pela população plebeia.

A variolização cresceu em popularidade na Europa ao longo do século XVIII e muitos médicos se tornaram especialistas, abrindo ambulatórios e enfermarias de ino-

culação para aplicar, apoiar e, eventualmente, cuidar daqueles que adoecessem após o procedimento, já que, apesar dos inoculados se tornarem, em geral, temporariamente sintomáticos, alguns sucumbiam à doença experimental. Como adquirira grande repercussão na corte britânica, a técnica acabou chegando às colônias inglesas da América, em 1721, onde homens brancos e escravizados passaram a ser também submetidos ao procedimento de imunização. O rei Carlos IV da Espanha, por sua vez, programou e financiou uma expedição, denominada de Real Expedição Filantrópica da Vacina, que levou a variolização às colônias espanholas da América, África e Ásia, entre 1803 e 1806. Efetivamente, a despeito de todas as controvérsias, a variolização produziu uma queda nos percentuais de mortalidade por onde foi adotada.

Interessante notar que, já naquela época, era conhecido pelos médicos que duas formas de varíola circulavam entre a população humana, sendo elas, a *variola major* com altas taxas de mortalidade e a *variola minor* com taxas mais reduzidas. Ambas, contudo, poderiam apresentar febre, mal estar, náuseas, cefaleia, dores musculares e/ou abdominais, delírio e lesões cutâneas pustulares nos membros e na face. A inalação natural de particular virais determinava, independentemente do tipo de varíola, uma infecção mais grave do que a infecção induzida, produzida por uma pequena ferida intencional na pele, por onde as secreções purulentas obtidas das pústulas de indivíduos doentes eram inoculadas. A ideia empírica da variolização consistia em se inocular o vírus (pústulas), de preferência de *variola minor*, para estimular o organismo a combater a infecção. Para tanto, alguns mecanismos de inoculação eram empregados. No oriente, se utilizavam crostas ressecadas e pulverulentas das pústulas que eram sopradas e insufladas através de um logo tubo colocado nas narinas dos pacientes. Na Europa e nas colônias americanas, o mais comum era esfregar o material das pústulas de um caso leve selecionado (*variola minor*), através de um arranhão entre o polegar e o indicador. Inoculações subcutâneas por escarificação eram feitas também com pequena lanceta embebida com material fresco retirado de lesões pustulosas maduras. Esse procedimento deveria ser feito em indivíduo com boa saúde que, invariavelmente, desenvolveria uma varíola branda, sem a formação de cicatrizes e baixa mortalidade. Além da condição clínica do paciente, o pequeno inóculo e o único ponto de infecção eram uma das origens do sucesso desse procedimento.

Não há dúvidas de que a variolização foi uma tentativa positiva de controle da doença num período onde a medicina era pouco científica e fundamentada em teorias equivocadas pela falta de conhecimento sobre a microbiologia e a fisiopatologia. Em função das taxas de mortalidade observadas na variolização, contudo, muitos médicos consideravam a prática arriscada, relativizando, por isso, os resultados positivos. Nesse momento, surgiu a figura de Edward Jenner com suas observações e trabalho documental acerca da varíola bovina como um imunizante mais seguro para os pacientes.

Jenner tem suas origens no interior da Inglaterra, onde viveu toda a sua vida. Ele nasceu em Berkeley, uma localidade próxima à cidade de Gloucester, em 17 de maio de 1749. Jenner era o oitavo de nove filhos do revendo Stephen Jenner (1702-1754) e Sarah Jenner (1709-1754). Três de seus irmãos morreram na infância e, em 1754, após a morte do nono e último irmão de Jenner, sua mãe e seu pai também faleceram, ficando o jovem Jenner órfão aos 5 anos de idade. Em decorrência disso, ele foi criado por suas irmãs mais velhas, Mary de 24 anos, Sarah, de 16 anos, e Anne, de 13 anos, bem como por sua tia Deborah, que assumira o lugar de sua mãe.

Em 1757, aos oito anos de idade, ele ingressou na escola primária Wotton-under-Edge, dirigida pelo reverendo Washburn, em Cirencester. Nessa escola, estudou grego, latim e francês e começou a se interessar pelas ciências naturais e pela pesquisa de fósseis. Em Cirencester, Jenner fez amizades que o acompanhariam por toda a sua vida, inclusive em sua carreira médica. No ano de sua entrada nessa escola, a varíola eclodiu no país e Jenner, como as outras crianças, foi submetido à variolização pelo farmacêutico local. Nesse procedimento, ele desenvolveu uma doença grave que quase o vitimou.

Em decorrência de seu gosto pela natureza e pelo meio ambiente, Jenner decidiu estudar medicina. No entanto, por não possuir muitos recursos para custear sua perma-

nência na faculdade de medicina de Oxford, onde seus irmãos mais velhos estudaram, ao terminar sua formação escolar, em 1763, seguiu para uma estágio prático em Chipping-Sodbury, próximo de Bristol, com o cirurgião John Ludlow. Nos seis anos em que esteve com Ludlow, ele aprendeu a praticar medicina como médico de família. Nessa época, Jenner entrou em contato com a varíola bovina que também era transmitida ao ser humano e parecia conferir um efeito protetivo contra a varíola humana.

Após o período de estudo em Chipping-Sodbury, por conselho de Ludlow, Jenner se transferiu, em 1770, para o Hospital Sant George em Londres, onde foi acolhido pelo cirurgião John Hunter (1728-1793), um dos maiores cirurgiões da Inglaterra, que também era um respeitado biólogo e naturalista, anatomista e pesquisador. Por dois anos, ele estudou cirurgia com Hunter e anatomia com seu irmão, William Hunter (1718-1783), tornando-se especialista em medicina e cirurgia. Essa experiência de estudo e trabalho com J. Hunter estimulou também o grande interesse por ciências naturais que Jenner sempre demonstrou ter. Durante sua curta estada em Londres, ele conseguiu estabelecer contatos importantes nessa área como, por exemplo, com Joseph Banks, naturalista que participou da primeira viagem do capitão Cook ao redor do mundo, a bordo do navio Endeavour, trabalhando com ele, a partir de 1771, na classificação das muitas espécies de animais, plantas e minerais coletados na viagem de Cook. Importantes contatos foram, da mesma forma, estabelecidos na área médica com Henry Cline (1750-1827), respeitado cirurgião, e Everard Home (1756-1832), cirurgião e eminente anatomista, ambos futuros presidentes da *Royal Society of Surgeons*. Próximo do fim de seu estágio, Hunter ofereceu a Jenner uma posição no hospital como assistente, por sua habilidade no magistério e na dissecação de cadáveres, entretanto, ele decidiu retornar, em 1772, a Berkeley. Apesar do retorno de Jenner a sua cidade natal, a profunda amizade com Hunter perdurou até a morte do cirurgião em 1793.

Em Berkeley, ele se associou a seu irmão mais velho para juntos iniciarem a prática da cirurgia e, em algumas situações, da medicina geral. Além de primariamente cirurgião, era boticário, produzindo e administrando medicamentos. Associado às suas atividades, praticava também a variolização. Jenner ainda desempenhava o papel de consultor médico, sendo frequentemente chamado por colegas para opinar sobre diferentes e complicados casos. Em função de suas atividades, costumava fazer longas e cansativas viagens a cavalo.

Em concomitância com sua prática clínica, Jenner realizou uma série de estudos e pesquisas experimentais. Inclusive, por conta disso, em 1775, John Hunter convidou-o para lecionar história natural e anatomia humana comparada, em Londres, o que foi gentilmente declinado por Jenner, que preferia ser pesquisador, naturalista e exercer a cirurgia e a medicina no interior do país.

Dentre suas pesquisas médicas, desenvolveu, em 1783, uma medicação emética e antipirética, denominada tártaro emético. Nesse mesmo ano, também propôs um tratamento para a oftalmia. Em estudos de biopsia de pulmão de pacientes com queixa de “dor no peito”, concluiu, em uma publicação de 1797, que depósitos de gordura nas grandes artérias pulmonares tinham algo a ver com o surgimento da *angina pectoris*. Com base em dissecações, reconheceu a conexão entre o estreitamento da válvula mitral e a ocorrência de doenças cardíacas.

Na biologia, Jenner realizou ensaios sobre genética e transmissão de características parentais em cruzamentos de cães de diversas raças e desenvolveu pesquisas sobre especiação com o cruzamento de animais de espécies diferentes como, por exemplo, cães e raposas. Estudou o movimento muscular e o aparelho auditivo dos peixes. Avaliou o uso do sangue humano como fertilizante de plantas com vistas a aumentar a produção de vegetais de interesse agrônômico, bem como investigou se o esterco animal também poderia ser empregado como suplemento agrícola. Fez também interessantes estudos sobre o comportamento de aves migratórias e, em particular, investigou detidamente o comportamento de espécies de cuco, descobrindo que a fêmea coloca seus ovos no ninho de outras aves que tenham ovos de aspectos parecidos para serem por essas

chocados e que seus filhotes ao eclodirem empurram os ovos ou os filhotes da outra ave. Ele publicou esse estudo em 1788 e, em decorrência disso, foi aceito como membro titular na *Royal Society*, em 1789.

Na área da engenharia, em 1784, ele ainda construiu e lançou duas vezes balões de hidrogênio não tripulados que, no primeiro voo, conseguiram pousar a uma distância de 16 km do ponto de lançamento. As pesquisas de Jenner com balões foram iniciadas na esteira das demonstrações públicas de sucesso com esse objeto que estavam ocorrendo em diversos lugares da Europa, incluindo a França e a própria Inglaterra.

Relativamente às suas pesquisas, o estudo da varíola e da varíolização foi o que elevou o nome de Edward Jenner a uma posição de destaque na medicina, colocando-o no *Panteão* dos grandes médicos da história da humanidade. Apesar da varíolização, como prática de imunização, ser conhecida, sem nenhuma determinação de causa, desde a antiguidade, a forma como Jenner demonstrou em seus ensaios a capacidade protetiva dessa prática, pode ser considerada a primeira prova metódica de imunização conferida por uma vacina. Na verdade, ele conduziu suas investigações a partir de uma ideia comum entre os camponeses da segunda metade do século XVIII de que indivíduos que se ocupavam em ordenhar vacas não contraíam a varíola humana (mito da leiteira), mas sim uma doença com lesões semelhantes às aquelas observadas com frequência nas vacas de produção de leite. Essa situação, contudo, tinha sido constatada pelo próprio Jenner, ainda quando era um jovem médico, em suas rondas e visitas aos pacientes em suas casas ou fazendas. Jenner, por isso, catalogou gradualmente evidências circunstanciais de uma série de casos que tinham em comum o fato dos pacientes declararem já ter tido varíola bovina em algum momento de suas vidas, o que parecia, de alguma forma, torná-los resistentes, quando expostos à varíola ou submetidos à varíolização.

Jenner observou que a varíola bovina estava normalmente confinada aos tetos e ao úbere dos animais adultos e à boca dos bezerros lactantes e que se caracterizava pela formação de pápulas endurecidas e avermelhadas que se transformavam em vesículas, havendo, posteriormente, a formação de crostas. De forma benigna, essas mesmas lesões eram observadas nas mãos, nos braços e antebraços das pessoas que faziam a ordenha dos animais doentes. Com o conhecimento empírico de que esses ordenhadores pareciam naturalmente imunizados para a varíola humana e de acordo com suas observações e experiência profissional, Jenner começou a aventar a possibilidade de fazer uma inoculação com material de lesão animal.

Ao concluir as pesquisas sobre a transmissão da doença para humanos e determinar o desenho de estudo do projeto, ele decidiu realizar seu experimento para verificar sua hipótese. Assim, no dia 14 de maio de 1796, sua investigação foi levada a termo. Nesse dia, Jenner, após examinar as mãos de uma ordenhadora cujo nome era Sarah Nelmes e constatar a presença de lesões características da doença bovina (adquirida de uma vaca conhecida como Blossom), coletou e inoculou o material da lesão por duas escarificações pequenas e superficiais no braço de uma criança de 8 anos chamada James Phillip, que era filho de seu jardineiro. Por cerca de quase duas semanas, Phillip se queixou de desconforto axilar e apresentou febre, calafrios, falta de apetite e cefaleia. Passado esse período, todavia, a pequena cicatriz produzida pela infecção se fechou, tornando-se, aos poucos, imperceptível.

Na consecução de seus estudos, em 01 de julho do mesmo ano, Jenner inoculou em Phillip material de lesão proveniente de um indivíduo com a doença humana ativa. A sintomatologia apresentada pela criança foi uma leve reação típica daqueles indivíduos que contraíam natural e previamente a varíola animal. Uma segunda inoculação com material de varíola humana foi novamente realizada em Phillip que reproduziu os mesmos resultados iniciais.

Após esse experimento com Phillip, durante os dois anos seguintes, não houve a ocorrência de nenhum caso de varíola animal, o que fez com que as pesquisas de Jenner tivessem que ser suspensas. No entanto, em 1798, uma nova epizootia da doença surgiu em sua região e ele pôde retomar seus trabalhos investigativos. Jenner, nesse

retorno, foi anotando meticulosamente os resultados obtidos a partir dos novos indivíduos inoculados, inclusive o de seu filho de 11 meses, Robert.

Como tinha um bom material proveniente de suas anotações e observações, ele decidiu enviar um artigo, onde fazia uma breve descrição e análise de seu experimento, à *Royal Society*, em 1798. Contudo, essa instituição, na pessoa de seu presidente, Joseph Banks, rejeitou elegantemente o trabalho, alegando insuficiência de dados e alertando Jenner sobre o perigo de ele cair em desgraça perante a comunidade científica inglesa e mundial por advogar ideias que conflitavam diametralmente com o pensamento acadêmico vigente, principalmente no que tangia “variolarizar” pessoas com material animal. Apesar dessa negativa, ele decidiu editar um livro de 75 páginas com a descrição de 22 casos de vacinação com a varíola bovina. No final desse ano de 1798, publicou, então, o livro intitulado “*Uma investigação sobre as causas e efeitos da Variolae vaccinae: uma enfermidade descoberta em alguns dos condados ocidentais da Inglaterra, em particular Gloucestershire, e conhecida por Varíola Bovina*”. O livro era composto por três partes onde ele discutia a origem da varíola como sendo uma doença de equinos que passava aos bovinos e poderia ser transmitida a humanos, expunha sua hipótese sobre a varíola bovina proteger frente a varíola humana, apresentava uma análise crítica sobre a testagem dessa hipótese e avaliava suas descobertas e uma série de questões diversas relacionadas à varíola. Nessa oportunidade, Jenner cunhou ainda o termo vacina e vacinação como corruptela do nome latino *vacca*, para nominar o inóculo e o método. A partir de seus estudos, Jenner concluiu que a vacinação fornecia imunidade vitalícia que poderia ser conferida artificialmente, através da inoculação braço a braço, e que a varíola bovina em humanos nunca era fatal, causando apenas pústulas localizadas.

Apesar da obra de Jenner ter adquirido uma rápida difusão, sendo inclusive traduzido em outras línguas, obteve uma aceitação desigual da classe médica. Alguns grupos eram entusiastas (pró-vacina), outros eram críticos ferozes (antivacina ou pró-variolarização), questionando a autenticidade do método ou comparando sua eficácia em relação à variolarização tradicional, os efeitos colaterais e a capacidade protetiva. Entre seus detratores estavam importantes personalidades da medicina da Inglaterra e da Europa e o grupo dos inoculares que faziam variolarização como um empreendimento comercial.

Na verdade, muitos problemas surgiram, além da oposição dos médicos e dos comerciantes de variolarização, um deles estava relacionado ao inóculo que poderia ser contaminado com misturas de material de lesão humana e animal ou composto por material degradado e que, por isso, produziam resultados conflitantes ou não esperados no pós-vacina. Como causa de contaminação do material estava o uso da mesma lanceta para variolarizar e vacinar. Em decorrência disso, Jenner teve que publicar textos complementares para esclarecer essa situação como “*Outras observações sobre a Variolae vaccinae*”, em 1799, e “*Uma continuação de fatos e observações relativas à Variolae vaccinae*”, em 1800. Somado isso, equívocos de conceito, superstições como as que diziam que os vacinados iriam se “bovinizar” e conteúdos publicitários mal intencionados (*Fake News*) conturbaram essa fase inicial da história da vacina. Para defender suas ideias e explicar seu método, Jenner realizou inúmeras viagens à Londres, proferiu conferências e se reuniu com diversas autoridades médicas, acadêmicas e políticas, bem como o clero, a nobreza e a família real.

Nesse período inicial, a paternidade do método foi também questionada. A posição de Jenner como o primeiro a utilizar a vacinação foi contestada sob o argumento de que a proteção conferida pela varíola bovina e a vacinação já eram conhecidas há muito tempo na Índia, Pérsia, Andes e nas áreas rurais da Dinamarca, Alemanha e da própria Inglaterra. Inclusive, foi recuperada a história de um fazendeiro chamado Benjamin Jesty que, em Yetminster, em 1774, teria vacinado sua mulher e seus filhos. Outras histórias pregressas de vacinação realizadas por fazendeiros, professores e religiosos em grupos limitados ou de familiares foram também lembradas em desfavor de Jenner. No entanto, ainda que esses fatos sejam anteriores à vacinação jenneriana, não foram publicados e nem razoavelmente explicados no âmbito científico com fez Jenner.

Aos poucos, contudo, o método de vacinação foi ganhando aceitação por parte da comunidade médica e dos membros da sociedade inglesa e europeia em geral que se mostravam refratários, principalmente depois de uma pesquisa de cunho nacional implementada por Jenner, para produzir provas sobre a resistência à varíola humana ou à variolização em indivíduos que se contaminaram com a varíola bovina, e cujos resultados confirmaram sua teoria. Dessa forma, o uso da vacinação se espalhou pelos países da Europa e suas colônias na América, África e Ásia. A vacinação, por exemplo, foi empregada por Napoleão Bonaparte para imunizar suas tropas contra a varíola. Napoleão, inclusive, mesmo estando em guerra com a Inglaterra, concedeu a Jenner uma medalha como honraria francesa pelos seus feitos na medicina. Campanhas de vacinação foram realizadas e, em 1807, cerca de 165.000 pessoas foram imunizadas na Inglaterra. O valor da vacinação foi reconhecido publicamente pela própria Inglaterra, quando o parlamento britânico concedeu a Jenner a quantia de 10.000 libras, em 1802, e depois, numa outra oportunidade, em decorrência da confirmação de sua eficácia pelo *Royal College of Physicians*, foram concedidos mais 20.000 libras, em 1807. Gradualmente, a vacinação foi substituindo a variolização no mundo. Em 1840, após mudanças na legislação, a variolização foi proibida na Inglaterra, o que foi seguido por várias outras nações. Além disso, diversos países da Europa foram tornando a vacinação compulsória para suas populações infantil e adulta, entre eles a Dalmácia (1807), Baviera (1807), Dinamarca (1810), Hanover (1816), Noruega (1816), Suécia (1816) e Itália (1888).

Em sua vida particular e profissional Jenner era considerado uma pessoa amigável, espirituosa, com uma mente investigativa e inovadora e com uma ampla rede de conhecimento interpessoal no mundo médico e científico e bons contatos sociais. Sempre cercado por muitos amigos, ele gostava de recebê-los em sua casa ou encontrá-los em pubs ou restaurantes. Jenner era um homem culto que desenhava, tocava violino e flauta e escrevia e declamava poesias. Por seu gosto por conversas amenas e pela troca de ideias, ele ajudou a fundar, na região rural onde nascera, a *Medico-Convivial Society (Gloucestershire Medical Society)* que se caracterizava por ser um ambiente de discussão sobre assuntos relevantes para a medicina daquele tempo, como a varíola e as doenças cardíacas, e também sobre temas ligados à cultura, arte, música e filosofia, tudo isso regado a boa comida e bebida. A *Convivio-Medical Society* era a outra sociedade em que Jenner também participava, mas como membro, e que seguia a mesma orientação da *Gloucestershire Medical Society*.

Apesar de ter recebido a outorga para desempenhar as funções de cirurgião (1770), a rigor, no início de sua carreira, Jenner não era médico. Ele só passou a poder exercer essa atividade, após a emissão do diploma de medicina pela Universidade de Sant Andrews da Escócia, em 1792. Alguns anos depois, em 1813, a Universidade de Oxford também lhe conferiu um outro diploma de médico. Dessa maneira, o prestígio profissional de Jenner aumentou consideravelmente, no entanto, ele nunca foi aceito no *Royal College of Physicians*.

Em 1785, ainda atuando como cirurgião, conseguiu comprar uma casa (The Chantry Cottage), na cidade de Berkeley pertencente condado de Gloucestershire, onde se estabeleceu e passou a realizar seus estudos sobre a varíola bovina. Nessa casa, na área do jardim, foi construída, por um de seus amigos, uma cabana que Jenner batizou de "Templo da Vacina" e que foi utilizada para a aplicação de vacinas em indivíduos pobres ou com poucos recursos, nada sendo cobrado. Na verdade, Jenner nunca patenteou seu método, temendo que isso pudesse tornar a vacinação inacessível à população de baixa renda.

Em 1788, Jenner, então com 39 anos de idade, decidiu se casar com Catherine Kingscote (1759-1815), uma jovem de 27 anos que conhecera quando fazia experimentos com balões de hidrogênio. Um de seus balões caiu em Kingscote Park que era de propriedade do pai de Catherine. Dessa união, nasceram seus três filhos, Edward Robert Jenner (1789-1810), Catherine Fitzhardinge Jenner (1794-1833) e Robert Fitzhardinge Jenner (1797-1854). Infelizmente, seu primeiro filho viria a falecer, em 1810, e sua

esposa, em 1815, ambos de tuberculose. Nessa mesma época, faleceram também de tuberculose sua irmã Mary, em 1810, e sua irmã Anne, em 1812.

Em decorrência de ter contraído tifo e ter tido uma longa convalescença, transferiu-se de Berkeley para uma cidade próxima, conhecida como Cheltenham, onde adquiriu uma casa, em 1795, passando longas temporadas nessa região de águas termais e minerais, retornando, frequentemente, a Berkeley, para descansar, resolver questões de ordem particular e vacinar a população local. Em Cheltenham, Jenner teve mais tempo para organizar e escrever suas experiências com a varíola animal e a vacinação, o que redundou na testagem de suas hipóteses em 1796.

Mesmo tendo sido muito combatido violentamente por pessoas que não concordavam com suas ideias, Jenner teve também, ao mesmo tempo, suas qualidades exortadas, sendo considerado um médico respeitável e visionário por muitos de seus contemporâneos. Por seus trabalhos na medicina e na biologia, recebeu mais de 46 títulos honoríficos em diferentes sociedades científicas e universidades por todo o mundo. Em 1789, Jenner foi eleito membro da prestigiosa *Royal Society* para a área da zoologia, com o estudo sobre a ornitologia do Cuco. Em sua homenagem, a família real britânica criou a *Royal Jennerian Society for Examination of the Small Pox*, em 1803. Ele foi nomeado ainda “médico extraordinário do rei”, em 1821, pelo rei George IV da Inglaterra.

Com a morte de sua esposa, filho e irmãs, Jenner foi se sentindo progressivamente abatido e, aos poucos, foi se afastando da atividade médica e da vida pública, exercendo apenas a função de juiz de paz, em Berkeley, para a qual tinha sido designado, pela magistratura local. Associado a essa melancolia crescente, sua saúde foi também se deteriorando. Em 1820, sofreu um pequeno acidente vascular encefálico, que não deixou sequelas. Entretanto, em uma manhã de inverno de 1823, após visitar um paciente moribundo que era seu amigo, ele sofreu um novo acidente vascular encefálico, sendo encontrado, por familiares, caído no chão de sua biblioteca, em Berkeley, com todo o lado direito paralisado. Infelizmente, nas primeiras horas do dia seguinte, em 26 de janeiro de 1823, Edward Jenner, em função do acidente cerebral sofrido, veio a falecer, aos 73 anos. Ele foi sepultado no jazigo de sua família, na Igreja de Santa Maria, de Berkeley, em 03 de fevereiro de 1823.

Interessante mencionar que, o conceito de vacina empregado atualmente e que tem um sentido mais amplo do que aquele dos tempos de Jenner, que estava vinculado apenas à varíola, foi proposto por Louis Pasteur. De acordo com Pasteur, esse termo deveria se referir a todo e qualquer método de imunização artificial, independentemente do agente microbiano empregado. Assim, durante o Congresso Médico de Londres, realizado em 1888, ele oficializou sua proposta, que teve grande adesão da comunidade científica da época, e que até hoje segue sendo aceita.

BIBLIOGRAFIA

- Bailey I. Edward Jenner, Benefactor to Mankind. In: Plotkin S. (eds) History of Vaccine Development. Springer, New York, NY. 2011; 21-25. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1339-5_4
- Baxby D. Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. *Vaccine*. 1999; 17, (4):301-307. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00207-2).
- Berche P. Life and death of smallpox. *La Presse Medicale*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104117>.
- Bloch H. Edward Jenner (1749-1823): The History and Effects of Smallpox, Inoculation, and Vaccination. *Am J Dis Child*. 1993;147 (7): 772-774. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1993.02160310074022>.
- Dworetzky M. Prometheus in Gloucestershire: Edward Jenner, 1749-1823. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 112 (4): 810-814.
- Lakhani S. Early clinical pathologists: Edward Jenner (1749-1823). *J Clin Pathol*. 1992; 45(9): 756-758.
- Larocca LM, Carraro TE. O mundo das vacinas – caminhos (des)conhecidos. *Cogitare enferm*. 2000; 5 (2): 43-50. <http://dx.doi.org/10.5380/ce.v5i2.44884>.
- McNally J. Biography: A brief life of Dr Edward Jenner. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2001; 12 (1): 81-84. <https://doi.org/10.1053/spid.2001.21366>.

Morgan AJ., Poland GA. The Jenner Society and the Edward Jenner Museum: Tributes to a physician-scientist. *Vaccine*. 2011; 29 (Suppl. 4): 30, D152-D154. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.128>.

Newsom SWB. The life of Edward Jenner. *British Journal of Infection Control*. 2004; 5 (4): 30-33.

Quezada A. Los orígenes de la vacuna The origins of the vaccine. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2020. 31 (3): 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.07.002>.

Riedel S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2005; 18:1, 21-25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>.

Smith KA. Edward Jenner and the small pox vaccine. *Front. Immunol*. 2011; 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00021>.

Stewart AJ., Devlin PM. History of the smallpox vaccine. *Journal of Infection*. 2006; 52 (5):329-334. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.07.021>.

Tuells J. Historia de la vacunología: La decisiva contribución de Edward Jenner (1749-1823) a la defensa contra la viruela. *Vacunas*. 2007;1:53-60.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da Revista Brasileira de Análises Clínicas

Leptospirose: Características da enfermidade em humanos e principais técnicas de diagnóstico laboratorial

Leptospirosis: Characteristics of the human disease and main laboratory diagnostic techniques

Tatiane Mendes Varela Ramos¹

Ilana Teruszkin Balassiano²

Taissa de Souza Menezes da Silva³

Joseli Maria da Rocha Nogueira⁴

Resumo

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição geográfica, com estimativa de cerca de 60.000 mortes por ano. A doença é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que possui mais de 300 diferentes sorovares e 64 espécies já identificadas, sendo o ambiente a principal fonte de contaminação. A doença em humanos apresenta manifestações clínicas variadas e caráter bifásico, devendo ser confirmada por meio do diagnóstico laboratorial. O objetivo deste trabalho foi reunir conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas. A MAT é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose, mas devido à baixa sensibilidade na fase inicial da doença é necessário o emprego de técnicas mais sensíveis neste período. Baseado em diversos estudos, as metodologias de PCR, ELISA-IgM e teste rápido apresentaram sensibilidade satisfatória nos primeiros dias após o início dos sintomas. Na segunda semana, a MAT apresentou 100% de sensibilidade, mantendo sua alta especificidade em ambas as fases. No geral, os testes sorológicos de ELISA-IgM e teste rápido apresentaram resultados satisfatórios como métodos de diagnóstico precoce, principalmente tratando-se de locais com pouca infraestrutura, diferente dos laboratórios de referência onde é possível empregar as técnicas de PCR e MAT.

Palavras-chave

Leptospirose humana; Espiroquetas; Diagnóstico Laboratorial

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição geográfica presente em praticamente todo o planeta. Estima-se que a cada ano ocorram 1,03 milhão de casos e 58.900 mortes, o que torna a leptospirose uma das zoonoses mais prevalentes no mundo.⁽¹⁾ Além disso, dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, no período de 2007 a 2019, foram registrados 48.670 casos confirmados de leptospirose humana e 4.287 óbitos, sendo notificada a maior incidência da doença nas regiões Sul e Sudeste.⁽²⁾

A doença é causada por espiroquetas invasivas pertencentes ao gênero *Leptospira*, sendo o ambiente contaminado a fonte de infecção indireta para o homem e outros mamíferos.⁽³⁾ A leptospirose humana torna-se epidêmica nas estações chuvosas, quando podem ocorrer enchentes,

sobretudo em cidades com condições inadequadas de saneamento básico, como esgoto a céu aberto e lixões, que propiciam a contaminação da água com urina de roedores, principalmente o *Rattus norvegicus* (ratazanas), que habitam comumente esses ambientes.⁽⁴⁾

O diagnóstico da leptospirose baseia-se principalmente no teste sorológico pela reação de microaglutinação, que é a técnica reconhecida como padrão-ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde, pela alta sensibilidade e especificidade, porém é limitada a centros de referência. O tratamento é baseado na antibioticoterapia, a qual apresenta maior eficácia nos primeiros dias após início dos sintomas.⁽⁵⁾

A eficácia do tratamento para a leptospirose depende principalmente do diagnóstico precoce da doença, o que tem levado à busca por técnicas laboratoriais mais modernas

¹ Doutoranda/Fiocruz (Laboratório de Zoonoses - IOC - FIOCRUZ).

² Doutorado/Fiocruz (Curadora da Coleção de *Leptospira* - IOC - FIOCRUZ).

³ Mestranda/ENSP (Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz).

⁴ Doutorado/Fiocruz (Chefe do Laboratório de Microbiologia - ENSP - FIOCRUZ).

Instituição: ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em: 18/02/2021

Aprovado em: 12/03/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102110

que ofereçam um resultado rápido e confiável, permitindo que a terapia antimicrobiana seja iniciada em tempo hábil para garantir sua eficiência.⁽⁵⁾

OBJETIVO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de reunir conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas, ampliando a compreensão a respeito da doença e do seu agente, além de fornecer informações importantes sobre a escolha do melhor método diagnóstico levando em consideração a característica bifásica da doença em humanos.

METODOLOGIA

O presente artigo de revisão foi constituído a partir de pesquisa bibliográfica baseada em artigos científicos contendo os dados mais relevantes para este trabalho. A busca foi realizada através da ferramenta de pesquisa PubMed, utilizando os termos leptospirose, leptospirosas, taxonomia, ambiente, diagnóstico laboratorial, PCR, MAT, ELISA-IgM e teste rápido, contemplando artigos dos últimos 10 anos, além de revisões clássicas citadas em diversas publicações em leptospirose.

ETIOLOGIA

O agente etiológico da leptospirose pertence ao gênero *Leptospira*, que compreende um grupo heterogêneo de espécies patogênicas e saprófitas. São espiroquetas que exibem uma forma em espiral longa, fina (0,1 a 0,2µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento) e flexível, sendo altamente móveis e apresentando uma ou ambas as extremidades em forma de gancho.⁽⁶⁾ São bactérias aeróbias obrigatórias, com crescimento fastidioso *in vitro*, e podem ser cultivadas em meios líquidos, semissólidos e sólidos, sendo o meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) o mais frequentemente utilizado. A temperatura ideal para o cultivo situa-se na faixa de 28°C-30°C e o tempo de geração em cultura ou em modelos animais é de 6 a 8 horas.⁽³⁾

As leptospirosas apresentam dois flagelos situados no periplasma que são responsáveis pela motilidade e compostos pelas proteínas FlaA e FlaB.⁽⁶⁾ A bactéria apresenta uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede de peptidoglicana estão intimamente associadas e envolvidas pela membrana externa. Nesta estrutura, o lipopolissacarídeo (LPS) constitui o principal antígeno para *Leptospira*, o qual apresenta uma baixa toxicidade para células animais, quando comparado ao LPS das bactérias Gram-negativas.⁽⁶⁾ Isto ocorre porque o LPS das leptospirosas difere da macromolécula tipicamente

encontrada nas bactérias Gram-negativas no que diz respeito às atividades biológicas, propriedade que possivelmente está relacionada com a estrutura única do lipídio A do gênero *Leptospira*.⁽⁷⁾ Outras estruturas presentes na membrana externa são as lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41, por exemplo), proteínas integrais de membrana e sistemas proteicos de secreção (T2SS, por exemplo).⁽⁸⁾

Desde 1907, após sua descrição original por Stimson, o gênero *Leptospira* foi dividido tradicionalmente em dois grupos: saprófitas (*Leptospira biflexa*) e patogênicas (*Leptospira interrogans*). O conceito evoluiu e essas duas espécies foram submetidas a dois esquemas de classificação, um baseado na sorologia, onde o sorovar representa a unidade taxonômica básica, e outro baseado na análise do DNA, o qual utiliza a taxonomia molecular para identificar espécies.⁽⁸⁾ A classificação sorológica baseia-se na reatividade de antígenos de superfície contra anticorpos específicos, sendo o LPS o antígeno responsável pela diversidade entre os sorovares.⁽⁸⁾ Por essa classificação já foram identificados mais de 300 sorovares, sendo a maioria patogênicos, agrupados em quase 30 sorogrupos, utilizando o Teste de Aglutinação Microscópica e o Teste de Aglutinação-Absorção Cruzada.⁽⁹⁾

Esquemas de classificação molecular envolvem estudos em análise filogenética e consideram também o nível de patogenicidade de cada espécie: saprófitas – presentes no ambiente e não causam infecção; intermediárias – possuem baixa virulência e estão relacionadas à doença branda; patogênicas – virulentas e causam infecção.⁽¹⁰⁾ O estudo mais recente, baseado em sequenciamento de *whole-genome* e genômica comparativa, revelou a existência de 64 espécies agrupadas em dois clados principais: saprófitas e patogênicas (inclui espécies responsáveis por doença em homens e animais e espécies ambientais que ainda não tiveram sua virulência elucidada). Estes clados são subdivididos em quatro subclados: P1 – Espécies patogênicas; P2 – anteriormente descritas no grupo intermediário; S1 – 21 espécies anteriormente classificadas no grupo saprófita; S2 – 05 espécies incapazes de estabelecer o processo infeccioso em modelos animais, porém exibem características de crescimento *in vitro* similares às de espécies patogênicas.⁽¹¹⁾

A grande questão concernente à taxonomia em *Leptospira* é que não há correlação entre as classificações sorológica e genética, pois alguns sorogrupos incluem cepas de até seis espécies diferentes, caracterizando a complexidade deste gênero bacteriano.⁽¹⁰⁾ No entanto, é possível identificar um determinado sorovar circulante e assim contribuir com os dados epidemiológicos de uma dada região, empregando-se tanto os métodos sorológicos de referência quanto os moleculares, como por exemplo o PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*).⁽¹⁰⁾

LEPTOSPIRAS E O AMBIENTE

As leptospiros patogênicas colonizam os rins dos reservatórios (várias espécies de mamíferos) e são eliminadas através da urina diretamente no ambiente, onde sobrevivem por longos períodos que podem variar de poucas horas a vários meses, dependendo da espécie do sorovar e das características da matriz ambiental.⁽⁴⁾

Os mecanismos que permitem a persistência de leptospiros patogênicos em ambientes aquosos, fora do hospedeiro, ainda são pouco conhecidos. Alguns estudos demonstraram que o ambiente viscoso favorece a permanência das leptospiros no solo, tornando-o potencialmente infectante, e como outras espiroquetas, as leptospiros podem alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais, incluindo agregação celular.⁽¹²⁾ A aderência é uma estratégia de sobrevivência bacteriana, característica do biofilme, representando um importante fator que pode estar envolvido na persistência das leptospiros fora do hospedeiro.⁽¹²⁾

A formação de biofilme já foi identificada (*in vitro*) para o gênero *Leptospira*, e pode conferir a capacidade de sobrevivência em diversos ambientes, mesmo sob escassez de nutrientes, tanto para as saprófitas quanto para as patogênicas.⁽¹³⁾ A persistência de cepas virulentas no ambiente (solo ou água) exerce um papel importante, pois constitui uma fonte de patógenos potencialmente infectantes naquele local.⁽¹⁴⁾ Após as fortes chuvas, as leptospiros virulentas presentes no solo entram em suspensão, juntamente com

outras partículas, tornando aquele ambiente aquoso uma fonte de contaminação para o homem e os animais.⁽¹³⁾

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE

A infecção por bactérias do gênero *Leptospira* pode ser assintomática ou produzir uma ampla variedade de sinais e sintomas que se confundem com outras doenças febris.⁽³⁾ Evidências sorológicas de infecção são encontradas em 15% a 40% dos indivíduos que foram expostos, mas não desenvolveram a doença.⁽³⁾ Nos casos sintomáticos de leptospirose, as manifestações clínicas variam de leve a moderada ou grave, podendo ser fatais. Mais de 90% dos indivíduos sintomáticos apresentam a forma mais branda e, geralmente, anictérica, enquanto a forma grave com icterícia ocorre em 5% a 10% dos pacientes infectados.⁽⁵⁾

A forma mais severa da doença, com danos sistêmicos que incluem injúria vascular, hepática, renal, pulmonar e músculo-esquelética, é conhecida como a Síndrome de Weil.⁽¹⁵⁾ O período de incubação é de uma a duas semanas, podendo variar de 2 a 30 dias. Nesses casos, a leptospirose em humanos apresenta um caráter bifásico, mas a distinção entre a primeira e a segunda fase nem sempre é tão evidente. A primeira fase, ou fase de bacteremia, corresponde à disseminação das bactérias no sangue e em outros líquidos corporais, com duração de 4 a 7 dias. A segunda fase, ou fase imune (Figura 1), inicia-se com o aparecimento de anticorpos e posterior eliminação das bactérias na urina de forma intermitente, tendo duração de 10 a 30 dias.⁽¹⁶⁾

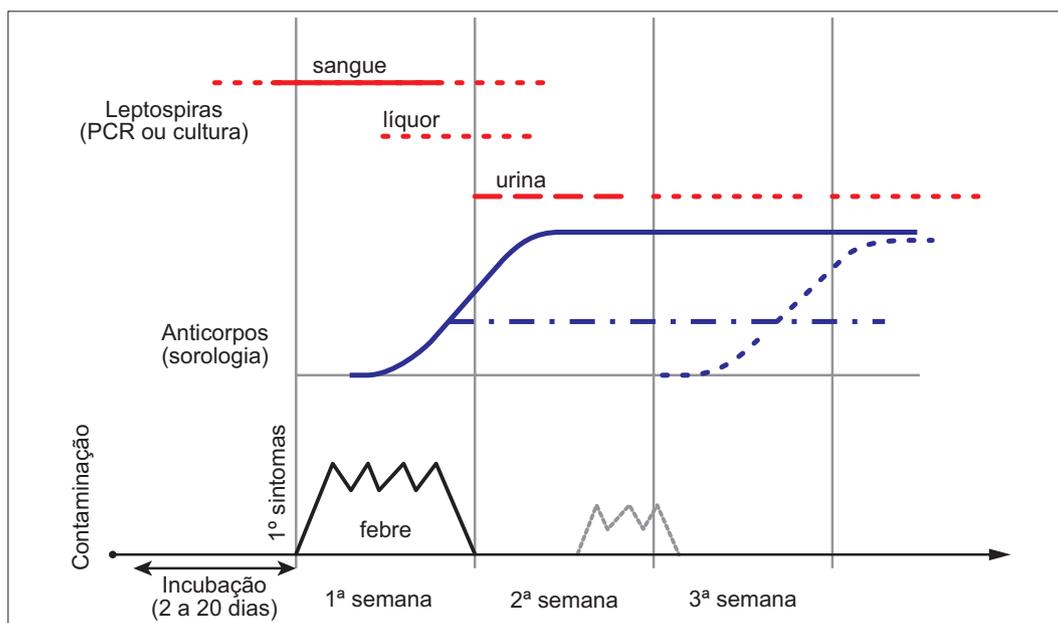


Figura 1. Esquema representando as fases da leptospirose e o emprego das técnicas de diagnóstico laboratorial mais adequadas. Adaptado de Goarant, 2016.⁽¹⁰⁾

PATOGÊNESE

A primeira etapa na patogênese da leptospirose é a penetração através da barreira tecidual, que é facilitada por abrasões na pele e pelo contato direto com as mucosas da conjuntiva ou cavidade oral.⁽⁷⁾ Nos períodos chuvosos onde ocorre a imersão em águas de enchentes ou até mesmo nas atividades recreativas aquáticas, o contato com águas contaminadas torna-se um fator de risco para infecção, principalmente pela exposição das mucosas.⁽¹⁷⁾

A transmissão pode acontecer pelo contato direto com um hospedeiro infectado, porém é mais comum através do solo e da água contaminados com urina de animais colonizados pelas leptospirosas. No entanto, atividades que envolvem manejo de animais infectados também são um risco de desenvolver a leptospirose.⁽¹⁵⁾

A segunda etapa na patogênese é a disseminação através da corrente sanguínea. Após atravessar a pele, leptospirosas patogênicas seguem pela circulação sanguínea e persistem nesta via durante a fase de leptospirose (bacteremia), diferente de outros espiroquetas patogênicos como *B. burgdorferi* e *T. pallidum*, os quais estabelecem a infecção na pele.⁽⁷⁾

Os mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose podem ser relacionados tanto aos efeitos diretos das leptospirosas no hospedeiro, quanto à resposta imune à infecção. Um mecanismo importante de virulência é a motilidade, que permite a migração dessas bactérias através de meios viscosos, sendo importante no início da infecção e na sua disseminação desde o sítio de entrada até os alvos dentro do hospedeiro.⁽¹⁶⁾

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A leptospirose não pode ser diagnosticada com base apenas em fundamentos clínicos devido à variabilidade nas manifestações sintomáticas, as quais se assemelham a outras enfermidades, o que torna necessária a confirmação por meio do diagnóstico laboratorial.⁽⁵⁾

Segundo Adler (2010), o critério para considerar um resultado indicativo de infecção recente por *Leptospira* spp. é aceito como um título ≥ 400 de aglutinação de leptospirosas na MAT, na presença de sinais clínicos e história epidemiológica, ou pelo aumento de quatro vezes no título entre amostras pareadas.⁽⁶⁾

Nos primeiros dias da doença, o diagnóstico envolve a detecção direta de *Leptospira* spp. em fluidos como sangue e líquido, pelo cultivo em meio específico (em geral, utiliza-se o meio EMJH) ou a detecção indireta pela técnica da PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), pois nesta fase inicial as leptospirosas circulam na corrente sanguínea. A partir da segunda semana, elevam-se os níveis de anticorpos das classes IgM e IgG (Figura 1), aumentando a sensibilidade

dos testes sorológicos, sendo a técnica de aglutinação microscópica (MAT – do inglês *Microscopic Agglutination Test*) o método padrão-ouro para investigação da leptospirose em humanos e animais.⁽⁵⁾

1. Cultura

Os principais meios de cultura desenvolvidos para o gênero *Leptospira* são o Korthof, Fletcher e Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), sendo este último o mais utilizado na rotina de isolamento de leptospirosas. Com o intuito de minimizar a contaminação do cultivo a partir de amostras clínicas, principalmente nos casos de urina, o antibiótico 5-fluorouracil pode ser empregado na preparação dos meios.⁽¹⁸⁾

As leptospirosas podem ser recuperadas de amostras de sangue e líquido, na fase aguda da doença. No caso de isolamento a partir de amostras de urina, esta deve ser coletada na segunda semana após o início dos sintomas.⁽⁵⁾ A duração da excreção destas bactérias na urina pode ocorrer por semanas, porém é necessário alcalinizar o pH da amostra, a fim de garantir a viabilidade das bactérias.⁽⁷⁾

Os cultivos em meio semissólido são incubados na faixa de 28°C-30°C, por várias semanas (6 a 13), ao abrigo da luz, sendo regularmente examinados ao microscópio de campo escuro para detecção do espiroqueta. Este exame identifica características como morfologia e motilidade, de modo que são necessárias outras técnicas para confirmação do gênero bacteriano e para a identificação da cepa isolada.⁽³⁾

O isolamento de leptospirosas de espécimes clínicos é a mais forte evidência para a confirmação do diagnóstico e permite a posterior identificação dos sorovares circulantes em uma determinada região.⁽⁷⁾ No entanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, dentre elas o crescimento fastidioso (dias a semanas) e a complexidade na tipagem, que pode demorar até meses e atrasar consideravelmente o diagnóstico.⁽⁵⁾ Contudo, a despeito das dificuldades, este é o método que melhor contribui para os estudos epidemiológicos da leptospirose. Outro detalhe importante é que a técnica de isolamento deve ser empregada antes do início do tratamento com antibióticos.⁽⁷⁾

Um estudo realizado por Boonsilp e colaboradores⁽¹⁹⁾ comparou a sensibilidade de detecção de *Leptospira* spp. empregando as técnicas de cultura e PCR. O estudo foi conduzido com 418 pacientes apresentando doença febril aguda a partir de amostras de sangue coletadas em heparina e EDTA para os métodos de cultura e PCR (detecção do gene *rrs*, que codifica o RNA ribossomal 16S), respectivamente. As cepas isoladas foram posteriormente sequenciadas para identificação da espécie. Do total de amostras (418), 39 (9%) foram positivas no cultivo e 81 (19%) foram positivas na PCR (e negativas na cultura). Os resultados deste estudo demonstraram que há uma alta taxa de falso negativo no exame baseado na cultura, comparando-se com a PCR. Além disso, especula-se que o pré-tratamento

com antibióticos pode influenciar na baixa sensibilidade do isolamento por cultivo.

2. PCR (*Polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase)

A técnica da PCR tem sido utilizada para a detecção de *Leptospira* spp. a partir de amostras clínicas por muitos anos, objetivando o diagnóstico precoce da leptospirose, que deve ocorrer na fase aguda da doença, ou fase de leptospiremia, o que é crucial para que a terapia antimicrobiana seja administrada de forma eficaz (WHO, 2003). A utilização de PCR em tempo real tem sido uma ferramenta de grande importância para agilizar o diagnóstico da leptospirose, principalmente na fase aguda da doença.⁽²⁰⁾

Atualmente, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos são usadas a partir de amostras de sangue, urina e líquor, e têm como alvo genes específicos tanto para detecção do gênero *Leptospira* (ex: *rrs* e *secY*) quanto para espécies patogênicas (ex: *lfb1*, *lipL32*, *ligA* e *ligB*), de modo que DNA de outros espiroquetas, como *Borrelia* spp., por exemplo, não são amplificados.^(21,22)

Além da pesquisa em amostras clínicas, o gene *lipL32* tem sido utilizado como alvo para detecção de leptospiros patogênicas em amostras ambientais, pois durante o isolamento, as amostras (água e solo) coletadas podem carrear cepas saprófitas, as quais acabam por se multiplicar mais rapidamente no meio de cultivo e mascarar a presença das patogênicas.⁽¹³⁾ A detecção indireta pela técnica molecular aumenta a sensibilidade do método, uma vez que este gene está presente em todas as espécies patogênicas, porém ausente nas espécies intermediárias e saprófitas.⁽²³⁾

Os métodos moleculares, embora promissores, depararam-se com a dificuldade de acesso às plataformas, principalmente quando se trata de ambientes remotos ou rurais, além da exigência de alto nível técnico para tal metodologia.⁽¹⁰⁾ Outra limitação do diagnóstico da leptospirose baseado em PCR é a incapacidade de identificar tanto a espécie quanto o sorovar infectante.⁽⁷⁾ Entretanto, esta informação pode não ser significativa para o tratamento individual do paciente, mas é de grande importância para a vigilância epidemiológica.⁽⁷⁾ Apesar das limitações relacionadas às técnicas moleculares, a demonstração da presença de leptospiros patogênicos ou de seu DNA, em qualquer um dos fluidos biológicos mencionados anteriormente, permite o diagnóstico precoce, definitivo e correto da leptospirose.⁽¹⁰⁾

3. Testes sorológicos

Devido à baixa sensibilidade do isolamento de leptospiros em cultura e das dificuldades técnicas encontradas em alguns laboratórios para a realização da PCR, a maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada pela sorologia. Na primeira fase da doença, 5 a 7 dias após o início dos sintomas, os anticorpos da classe IgM já são detectáveis.

A partir da segunda semana, ambas as classes IgM e IgG podem ser detectadas pelas técnicas sorológicas.⁽⁵⁾

3.1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A complexidade do teste de MAT leva ao emprego de testes sorológicos mais simples, que podem ser utilizados na fase aguda da doença, permitindo o diagnóstico precoce da leptospirose. ELISA é uma técnica que tem sido amplamente utilizada no diagnóstico da leptospirose, pela detecção dos anticorpos da classe IgM, que tem maior importância quando se trata de amostras coletadas na fase aguda da doença, pois este anticorpo está presente na primeira fase da resposta imune.⁽²⁴⁾

Existem muitos testes ELISA-IgM comerciais e a maior parte deles utiliza a espécie *Leptospira biflexa* (saprófita) para preparação de antígeno, pois apresenta reação cruzada com espécies patogênicas através de antígenos de superfície como o LPS, o que torna possível a detecção de anticorpos gerados contra uma cepa patogênica na amostra clínica.⁽²⁵⁾ Lipoproteínas recombinantes como a LipL32 ou LigA também foram desenvolvidas como preparação de antígenos para este teste.⁽⁸⁾

Além da praticidade e reprodutibilidade, outra vantagem do ELISA é que não requer a manutenção de culturas de antígenos vivos, como na MAT, o que é trabalhoso e de alto custo, restrito a centros de referência. Por outro lado, uma grande desvantagem desta técnica é que, sozinha, não pode assegurar o diagnóstico final, sendo necessária a confirmação pela MAT.⁽⁵⁾

Um estudo realizado por Rosa e colaboradores⁽²⁶⁾ demonstrou a eficácia do teste de ELISA-IgM como teste rápido para detecção precoce da doença, devido à alta sensibilidade, contribuindo para o melhor prognóstico dos pacientes e diminuindo a letalidade da doença. Estes achados sugerem que, embora não apresente a mesma especificidade do padrão-ouro (MAT), o teste pode ser utilizado como triagem em locais com pouca infraestrutura, o que contribui para o diagnóstico precoce da leptospirose.

3.2. Teste rápido

Qualquer esforço no desenvolvimento de um novo *kit* de diagnóstico rápido para leptospirose é valioso e significativo, pois permite o início do tratamento de forma adequada, oferecendo um bom suporte laboratorial. Os *kits* de teste rápido para leptospirose disponíveis no mercado também se baseiam na detecção do anticorpo IgM, justificando seu emprego na fase inicial da doença.⁽²⁷⁾

Nabity e colaboradores⁽²⁸⁾ realizaram um estudo para testar a precisão do teste rápido DPP (do inglês, *Dual Path Platform*), em amostras de casos severos e brandos de leptospirose. A sensibilidade em amostras de soro pareadas foi de 100% e 73% para doença severa e branda,

respectivamente. Na fase aguda o ensaio alcançou a sensibilidade menor para leptospirose severa e branda (85% e 64%, respectivamente). A sensibilidade do teste também foi similar ao ELISA-IgM. Os resultados demonstraram que o teste DPP apresentou uma performance aceitável para o diagnóstico da leptospirose severa e pode ser facilmente implementado em hospitais e postos de saúde. Contudo, a precisão do teste pode ser melhorada para os casos de doença branda e no estágio inicial, onde os sintomas são confundíveis com outras doenças febris, como dengue e hepatite, em regiões de alta transmissão da leptospirose.

Posteriormente, Nability e colaboradores⁽²⁹⁾ avaliaram a precisão do teste rápido DPP através de outro estudo, partindo de três tipos de amostra: gota de sangue (dedo), sangue venoso total em EDTA e soro. Os resultados demonstraram uma sensibilidade para leptospirose clássica de 93% para amostras de gota de sangue e 96% para sangue venoso total, ambos maiores que para o soro. Concluíram, então, que houve uma boa performance do teste DPP para amostra coletada de forma mais simples (gota), nos casos de leptospirose clássica, o que demonstra a viabilidade de utilização do teste em pequenas unidades de saúde.

Outros testes rápidos disponíveis no mercado também foram submetidos a avaliação de precisão, como o *Leptocheck-WB* e o teste *ImmuneMed Leptospira IgM Duo Rapid*. Alia e colaboradores⁽³⁰⁾ testaram amostras de pacientes com suspeita de leptospirose utilizando esses dois kits. A sensibilidade e especificidade gerais foram 47,37% e 80,65% para o *Leptocheck-WB* e 21,05% e 90,32% para o teste *ImmuneMed Leptospira IgM Duo Rapid*. Comparando os resultados a partir de amostras positivas previamente confirmadas na MAT, o primeiro teste mostrou maior sensibilidade (90,72%) do que o segundo (40,21%), porém os valores de especificidade foram similares, sendo 82,89% para o primeiro e 88,89% para o segundo. Com base nos resultados deste estudo, o teste *Leptocheck-WB* foi considerado o mais sensível para o rastreamento da leptospirose em ambientes hospitalares.

3.3. Teste de Aglutinação Microscópica (MAT, do inglês *Microscopic Agglutination Test*)

O MAT é uma técnica baseada na aglutinação antígeno-anticorpo, sendo o teste de referência para o diagnóstico da leptospirose, reconhecido como “padrão-ouro”. Esta técnica detecta anticorpos de ambas as classes, IgM e IgG, e determina o título de anticorpos, diferenciando infecção recente de contato prévio.⁽⁵⁾

O princípio da técnica é simples e consiste na reação do soro-teste com culturas de leptospirosas, observando então a formação de aglutinação ao microscópio de campo escuro em duas etapas. Na primeira observa-se apenas a formação de aglutinação e na segunda etapa, os soros são diluídos serialmente para determinação do título (recíproca da diluição). O ponto final de leitura é aquele em que se observa 50%

de aglutinação ou de leptospirosas livres, quando comparado ao controle do antígeno (sem soro). Utiliza-se uma bateria de antígenos vivos, representantes de 19 diferentes sorovares, recomendados pela OMS.⁽⁵⁾ Este número é limitado diante da diversidade de sorovares já reconhecidos e pode não contemplar um sorovar desconhecido em uma determinada região. Por conta disso, a cepa saprófita Patoc I (*L. biflexa*) está incluída na bateria de antígenos, pois apresenta reação cruzada com vários sorovares patogênicos.⁽³¹⁾

O MAT não tem a capacidade de detectar o sorovar infectante, uma vez que, dentro de um mesmo sorogrupo, todos os sorovares pertencentes a ele podem apresentar títulos similares, caracterizando uma reação inespecífica em nível de sorovar.⁽⁷⁾ Por esta razão, a interpretação da MAT é complexa, em especial na fase aguda da doença, onde ocorre alto grau de reação cruzada entre diferentes sorogrupos, o que difere da fase convalescente, onde se observa relativa especificidade de sorogrupo.⁽⁷⁾

Outro ponto a ser considerado é a dificuldade de concluir o diagnóstico da leptospirose pela MAT na fase inicial da doença, principalmente porque, em muitos casos, é necessária a análise de uma segunda amostra, o que se torna um desafio, uma vez que a maioria dos pacientes ambulatoriais não retorna para segunda coleta.⁽³²⁾ Além disso, os demais testes sorológicos empregados no diagnóstico laboratorial da leptospirose devem ser comparados a MAT, avaliando os critérios de especificidade e sensibilidade.⁽⁵⁾

Niloofta e colaboradores⁽³³⁾ conduziram um estudo com pacientes diagnosticados clinicamente para leptospirose e as amostras foram submetidas aos testes de MAT, ELISA-IgM e teste rápido (*Leptocheck -WB*). Nas amostras coletadas na fase aguda da doença, a MAT apresentou especificidade e sensibilidade de 95,7% e 55,3% respectivamente, comparando-se com o resultado da MAT total (fase aguda + fase convalescente – 100%). O teste rápido e o ELISA-IgM apresentaram sensibilidade similar, comparando-se com a MAT na fase aguda, apesar do ELISA-IgM mostrar maior especificidade (84,5%) que o teste rápido (73,3%). Segundo os pesquisadores, os resultados indicaram que o ELISA-IgM pode ser superior à MAT durante a fase aguda como método de diagnóstico precoce, e o teste rápido também apresentou-se adequado para este propósito.

Em contrapartida, Araghian e colaboradores⁽³⁴⁾ realizaram um estudo mais recente comparando as técnicas de MAT e ELISA-IgM em amostras de pacientes sintomáticos com suspeita de leptospirose. Os resultados revelaram uma sensibilidade de 82,4% no ELISA-IgM, comparado à sensibilidade de 100% na MAT. Os valores de especificidade mostraram uma diferença significativa entre os dois métodos (MAT – 100%, ELISA-IgM – 78,8%), mantendo a categoria de padrão de diagnóstico para a MAT.

Segundo Philip e colaboradores,⁽³²⁾ uma forma de melhorar a eficiência no diagnóstico da leptospirose é

associar outra técnica à MAT, quando se trata de amostras coletadas na fase aguda. De acordo com os resultados deste estudo, o emprego da técnica de PCR em conjunto com a MAT aumentou a eficácia no diagnóstico da doença, comparando-se com o uso das técnicas individualmente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, que pode levar ao óbito, quando ocorrem manifestações mais severas. Com o intuito de melhorar o prognóstico dos pacientes e iniciar o tratamento adequado, muitos estudos têm sido conduzidos para o desenvolvimento de técnicas mais simples e rápidas, que permitam o diagnóstico precoce e acurado da leptospirose.

Todas as técnicas conhecidas até o momento precisavam ser comparadas à MAT, que permanece como o teste padrão-ouro, reconhecido pela OMS. Contudo, por ser uma técnica complexa e laboriosa, torna-se inviável em locais sem a infra-estrutura dos centros de referência.

O emprego de técnicas de diagnóstico precoce, quando ajustadas às diferentes fases da doença, pode oferecer bons resultados, permitindo, assim, o início da terapia antimicrobiana dentro do intervalo de tempo em que seja efetiva, diminuindo, assim, o agravamento dos casos de leptospirose e possíveis internações. Além disso, o conhecimento das técnicas disponíveis e a viabilidade do uso de cada uma delas, no contexto logístico do laboratório disponível para o diagnóstico, reflete um melhor manejo de insumos, equipamentos e mão de obra especializada, o que implicará a rapidez e melhoria do diagnóstico bem como a brevidade do tratamento deste agravo nos casos positivos, como também a redução dos índices de óbitos por essa enfermidade em nosso país.

Abstract

Leptospirosis is the most widespread zoonosis, which has a balance of almost 60,000 deaths per year. Bacteria of Leptospira genus, which has more than 300 different serovars and 64 species already identified, cause the disease, being the environment the main source of contamination. The human disease presents a large set of clinical manifestations, showing biphasic presentation, the reason why leptospirosis must be confirmed by laboratory diagnosis. This study aimed to group recent concepts concerning human leptospirosis and the main diagnosis techniques employed at the laboratory. MAT is considered the gold standard for leptospirosis diagnosis, but has low sensitivity on the onset of disease, leading to the use of techniques with higher sensitivity on this period. Based on several studies, PCR, ELISA-IgM and rapid test presented satisfactory sensitivity on the onset of symptoms. In the second week, MAT showed 100% of sensitivity, maintaining its high specificity in both phases. In general, the ELISA-IgM and rapid serological tests showed satisfactory results as methods for early diagnosis, especially in the case of places with poor infrastructure, different from the reference laboratories where it is possible to use the PCR and MAT techniques.

Keywords

Human leptospirosis; Spirochaetes; Laboratory Diagnosis

REFERÊNCIAS

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9): e0003898.
- BRASIL. Casos Confirmados de leptospirose de 2007 a 2019. 2020. Disponível em: <<http://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/casos-conf-lepto-2007-2019.pdf>> acessado em: 03/01/2021.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: Medsci; 1999.
- Casanovas-Massana A, Costa F, Riediger IN, Cunha M, Oliveira D, Mota DC, et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. *Water Research*. 2018; 130: 176-184.
- World Health Organization (WHO): International Leptospirosis Society (ILS). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. 2003. Geneva: World Health Organization.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira and leptospirose*. *Vet Microbiol*. 2010; 140: 287-296.
- Haake DA e Levett PN. *Leptospirosis in humans*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387: 65-97.
- Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose *Leptospirosis* and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol*. 2017; 20(4): 184-193.
- Guemier V, Goarant C, Benschop J, Lau CL. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(5): e0006503.
- Goarant C. *Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries*. *Res Rep Trop Med*. 2016; 7: 49-62.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(5): e0007270.
- Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA. Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1802-6.
- Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*. 2020; 15 (1): e0227055.
- Kumar KV, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 2015; 91: fiv051.
- De Brito T, da Silva AMG, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018;60:e23
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:757-71.
- Levett PN. *Leptospirosis*. *Clin Microbiol. Ver*. 2001; 14: 296-326.
- Johson RC, Rogers P. 5-Fluorouracil as a Selective Agent for Growth of *Leptospirae*. *J Bacteriol*. 1964; 87: 422-6.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Day NP, Peacock SJ. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases*. 2011; 11:338.
- Riediger IN, Stoddard RA, Ribeiro GS, Nakatani SM, Moreira SDR, Skraba I, et al. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *leptospira* lipL32- based real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(9): e0005940.
- Waggoner JJ e Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Oct; 29(5): 440-5.
- Galloway RL and Hoffmaster AR. Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 199-200.

23. Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, Willingham AL, et al. Molecular Detection of Leptospiral DNA in Environmental Water on St. Kitts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11: 7953-7960.
24. Soo ZMP, Khan NA, Siddiqui R. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta Tropica*. 2020; 201: 105183.
25. Khaki P. Clinical laboratory diagnosis of human leptospirosis. *Int J. Enteric Pathog.* 2016; 4: e 31859.
26. Rosa MI, dos Reis MF, Simon C, Dondossola E, Alexandre MC, Colonetti T, Meller FO. IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet.* 2017; 22(12):4001-12.
27. Rao M, Amran F, Aqilla N. Evaluation of a rapid kit for detection of IgM against *Leptospira* in human. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019; 1-4.
28. Nability SA, Ribeiro GS, Aquino CL, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AH, et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(11): e1878.
29. Nability SA, Hagan JE, Araújo G, Damião AO, Cruz JS, Nery N, et al. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the dual path platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(2): e0006285.
30. Alia SN, Joseph N, Philip N, Azhari NN, Garba B, Masri SN, Sekawi Z, Neela VK. Diagnostic accuracy of rapid diagnostic test for the early detection of leptospirosis. *J Infect Public Health.* 2019;12(2):263-9.
31. Murray CK, Gray MR, Mende K, Parker TM, Samir A, Rahmam BA, et al. Use of a patient-specific isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105: 209-213.
32. Philip N, Affendy NB, Masri SN, Yuhana MY, Than LTL, Sekawi Z, et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. *PLoS ONE.* 2020; 15(9): e0239069.
33. Niloofa R, Fernando N, Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, et al. Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. *PLoS ONE.* 2015;10(6): e0129236.
34. Araghian A, Elmi A, Farahbakhsh M, Hosseini S, Faezi S. Seroepidemiology of leptospirosis in Guilan province, northern Iran: comparison between MAT and IgM-ELISA techniques. *J Infect Dev Ctries.* 2018; 12(2):109-114.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Laboratório de Microbiologia

Departamento e Ciências Biológicas

Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos

Rio de Janeiro-RJ, Brasil

E-mail: joselimaria@gmail.com

Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos

Bacterial resistance to antimicrobials: a review of the main species involved in infectious processes

Jaime Antonio Abrantes¹

Joseli Maria da Rocha Nogueira²

Resumo

Os mecanismos de resistência bacteriana podem existir de maneira intrínseca ou adquirida, porém em ambos os casos podem dificultar a terapia antimicrobiana preconizada para tratamento de infecções. Este artigo tem como objetivo apresentar estudos recentes sobre o assunto. Foi realizada uma revisão da literatura sobre resistência bacteriana aos antimicrobianos, utilizando as bases de dados MEDLINE, LILACS, Scopus e Web of Science. A busca identificou o total de 16 artigos, que foram publicados entre os anos de 2017 a 2021. A maioria dos artigos sobre Gram-negativos tratou do grupo das enterobactérias, assim como os de Gram-positivos tratou dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. A resistência bacteriana foi encontrada em cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, entre outros. Em relação aos mecanismos de resistência, as β -Lactamases de espectro estendido (ESBL), enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) foram relatados e observa-se que a maioria dos trabalhos corrobora que seu rastreamento visa minimizar a transmissão em instituições de saúde.

Palavras-chave

Farmacoresistência Bacteriana; Infecções Bacterianas; Microbiologia

INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas, em todo o mundo, são responsáveis pelo uso difundido de medicamentos da categoria antimicrobiana. Tais bactérias, relacionadas aos diversos tipos de infecções existentes, podem apresentar resistência aos antimicrobianos mais utilizados e, assim, prejudicar na terapêutica deste processo.⁽¹⁾

Os microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos para que os fármacos não produzam o efeito desejado. Atualmente, é possível observar a existência de diferentes espécies bacterianas que produzem efeitos locais e sistêmicos, que têm ampliado seu espectro de resistência com o passar dos anos, como cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), bacilos fermentadores ou não de glicose e bactérias de diversos outros grupos heterogêneos.⁽²⁻⁴⁾

Os mecanismos de resistência podem se apresentar de maneira intrínseca, quando as bactérias já possuem, em sua constituição, informações para apresentar o mecanismo responsável pela ineficácia do antimicrobiano, como também de maneira adquirida, onde o microrganismo recebe de outra célula, da mesma espécie ou não, informações que podem causar esta resistência. Esta informação recebida pode ser, por exemplo, um fragmento de material genético, que futuramente expressará uma enzima que degrade a molécula do fármaco utilizado contra a bactéria em questão.^(5,6)

Em contrapartida, na célula bacteriana as moléculas dos antimicrobianos se comportarão de acordo com os sítios de ação específicos de sua classe, assim como a própria bactéria agirá de acordo com a sensibilidade ou o tipo de resistência que esta apresenta. Essa capacidade é expressa laboratorialmente através de um perfil fenotípico

¹ Doutorando/Fiocruz (Laboratório de Microbiologia – ENSP – FIOCRUZ).

² Doutorando/Fiocruz (Chefe do Laboratório de Microbiologia – ENSP – FIOCRUZ).

em relação aos testes utilizados *in vitro*, subsidiando a indicação terapêutica ou a necessidade de testes complementares.^(7,8)

Os testes a serem realizados em laboratório podem ter dois objetivos distintos: detectar a forma como as bactérias se comportam em relação à exposição aos antimicrobianos (expressão) ou, então, ser testes genéticos que têm como alvo elementos moleculares que dão origem ao processo de resistência. Nos laboratórios clínicos, os testes de expressão ainda são os mais comuns, como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), realizado em quase todos os laboratórios de microbiologia no mundo.⁽⁹⁻¹³⁾

O objetivo deste artigo é fazer uma revisão na literatura dos últimos cinco anos sobre as principais bactérias envolvidas em processos infecciosos, bem como a análise da resistência aos antimicrobianos desses microrganismos. Tal estudo visa atualizar a comunidade científica acerca do problema de Saúde Pública tão persistente que é a resistência bacteriana e que, até então, não possui soluções contundentes para a erradicação.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão da literatura, onde foram utilizadas as bases de dados: MEDLINE, LILACS, Scopus e Web of Science, com os seguintes Descritores em Ciências da Saúde (DECS), bem como suas versões em inglês e espanhol: Farmacorresistência Bacteriana (*Drug Resistance, Bacterial / Farmacorresistencia Bacteriana*), Infecções Bacterianas (*Bacterial Infections / Infecciones Bacterianas*) e Microbiologia (*Microbiology / Microbiología*).

Os critérios de inclusão utilizados para a seleção da amostra foram: artigos publicados na íntegra, em português, inglês e espanhol, com origem brasileira ou estrangeira com parceria brasileira; todos os tipos de artigo, independentemente do método de pesquisa utilizado, e abranger um período de cinco anos (2017 até 2021), visando à atualidade dos dados consultados.

Como critérios de exclusão foram considerados: artigos com duplicidade, acesso restrito ao resumo, publicações sem aderência ao objetivo da pesquisa e aqueles que não atenderam aos critérios de inclusão. Após busca bibliográfica com aplicação dos filtros, critérios de inclusão e exclusão, realizou-se a leitura criteriosa do título e resumos, no intuito de verificar a consonância com o objeto de estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o refinamento com base nos critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos na pesquisa, a base de dados MEDLINE revelou um maior número de publicações, com oito (50%) resultados. Em seguida, LILACS com três (18,75%) resultados, Web of Science com três (18,75%)

publicações e Scopus com dois (12,5%) artigos incluídos. A busca identificou o total de 16 artigos, que foram publicados entre os anos de 2017 a 2021. Dois foram publicados em 2017 (12,5%), dois em 2018 (12,5%), dez em 2019 (62,5%), um em 2020 (6,25%) e um em 2021 (6,25%), como pode ser observado na Tabela 1.

A predominância de idioma foi o português, com 15 publicações (93,75%) e um artigo em inglês (6,25%). Quanto ao tipo de estudo, observa-se que a maioria é composta por artigos originais com 15 publicações (93,75%) e apenas uma revisão da literatura (6,25%). Das 16 publicações selecionadas, 13 são artigos indexados (81,25%) e três são dissertações (18,75%).

A hipótese da redução drástica de publicações a partir de 2020 é atribuída à pandemia de Covid-19, que chegou ao nosso país no início de 2020. Foi possível observar que entre os anos de 2017-2019 houve um crescimento no número de publicações sobre o tema, oferecendo maior subsídio para estudos futuros. Nota-se uma produção científica ainda escassa que reflete a necessidade de sensibilizar pesquisadores para a abordagem do tema, o que pode vir a favorecer um melhor manejo no tratamento e cura de infecções, visto que a evolução das mesmas é muitas vezes rápida e tem índice de morbimortalidade elevada.

Os antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos. São capazes de impedir a multiplicação, quando inibem parte do metabolismo (bacteriostáticos) ou gerar a morte de bactérias (bactericidas).^(14,15) Existem diversas categorias de antimicrobianos que podem, dependendo da sua estrutura química e arranjo molecular, apresentar uma ação específica na célula bacteriana, como, por exemplo, inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da síntese dos ácidos nucleicos, desorganização da membrana celular, interferência no metabolismo celular, entre outras.^(16,7)

A penicilina foi o primeiro fármaco antimicrobiano utilizado para o tratamento das infecções por *Staphylococcus aureus*. Em menos de um ano de uso, foi relatado um gene plasmidial que codifica uma enzima, β -lactamase, que destrói o anel β -lactâmico da penicilina, fazendo com que as moléculas deste antimicrobiano sejam inativadas.⁽¹⁵⁾ Os β -lactâmicos são uma classe ampla de antibióticos, possuem o núcleo β -lactâmico em sua estrutura molecular, como as cefalosporinas, as penicilinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos.⁽⁷⁾

Desde então, conforme foram surgindo novos antimicrobianos, as bactérias também começaram a expressar resistência, como forma de sobreviver aos ataques farmacológicos. Seja pela sua composição de parede celular, produção de alguma enzima, presença de proteínas de transporte ativo ou até mesmo vivendo em comunidades microbianas, estas bactérias causam infecções onde o tratamento se torna ineficaz, trazendo uma resposta clínica

inadequada.^(17,18) As bactérias resistentes podem apresentar uma gama de expressões, a fim de não sucumbir ao ataque dos antimicrobianos, como por exemplo alterações

de permeabilidade, alteração no local de ação, bombas de efluxo, inativação enzimática do antibiótico e formação de biofilmes.⁽²⁾

Tabela 1 - Publicações de acordo com microrganismos e antimicrobianos estudados, encontrados na literatura no período de 2017 a 2021

Autor/Ano	Gêneros e espécies	Antimicrobianos utilizados
Duo Filho <i>et al.</i> , 2021 ⁽⁴⁾	<i>Mycobacterium leprae</i>	Rifampicina, dapsona e clofazimina.
Pontes <i>et al.</i> , 2020 ⁽¹⁸⁾	Enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp. e <i>Enterococcus</i> sp.	Amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, ciprofloxacino, ceftriaxona, cefepime, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, meropenem, colistina, tigeciclina, entre outros.
Rocha <i>et al.</i> , 2019 ⁽³⁰⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Imipenem, meropenem e ertapenem.
Curto <i>et al.</i> , 2019 ⁽¹²⁾	Enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp. e <i>Enterococcus</i> sp.	Amicacina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, ciprofloxacino, cefotaxima, cefepime, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, cotrimoxazol, nitrofurantoína, norfloxacin, entre outros.
Atilano Carvalho <i>et al.</i> , 2019 ⁽²⁷⁾	<i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Oxacilina, vancomicina, cefepime, amoxicilina/clavulanato, cefotaxima, ceftazidima.
Sousa <i>et al.</i> , 2019 ⁽²⁹⁾	<i>Klebsiella</i> sp.	Amoxicilina, moxicilina/clavulanato, ampicilina, cefalexina, ceftiofur, meropenem, imipenem, amicacina, gentamicina, neomicina, enrofloxacin, ciprofloxacino, marbofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina, metronidazol, nitrofurantoína, sulfonamida/trimetoprima, entre outros;
Pancotto <i>et al.</i> , 2019 ⁽²⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	Amicacina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, ciprofloxacino, cefotaxima, cefepime, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, nitrofurantoína, norfloxacin, entre outros;
Oliveira <i>et al.</i> , 2019 ⁽²⁰⁾	Enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp. e <i>Enterococcus</i> sp.	Amicacina, ampicilina, ciprofloxacino, levofloxacino, cefepime, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, entre outros.
Póvoa <i>et al.</i> , 2019 ⁽²⁵⁾	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.	Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacin, nitrofurantoína, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, entre outros.
Mello, 2019 ⁽²⁸⁾	Enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus</i> sp.	Imipenem, meropenem, ertapenem, oxacilina e vancomicina.
Boaventura <i>et al.</i> , 2019 ⁽¹⁷⁾	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	Cefazolina, metronidazol, ciprofloxacino, cefalotina, ceftazidima.
Lima, 2019 ⁽²¹⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> .	Imipenem, meropenem, ertapenem, oxacilina, cefepime, ceftazidima, cefotaxima, amoxicilina/clavulanato.
Mota <i>et al.</i> , 2018 ⁽¹⁹⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amicacina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, ciprofloxacino, cefotaxima, cefepime, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, nitrofurantoína, norfloxacin, entre outros;
Carneiro <i>et al.</i> , 2018 ⁽²³⁾	<i>Klebsiella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Enterobacter</i> sp.	Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacin, nitrofurantoína, ceftazidima, gentamicina, imipenem, ertapenem, entre outros.
Ferreira <i>et al.</i> , 2017 ⁽²⁶⁾	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp.	Ácido nalidíxico, amicacina, amoxicilina/clavulanato, ampicilina, cefalotina, cefazolina, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, ofloxacino, sulfametoxazol/trimetoprima, entre outros.
Silva, 2017 ⁽²²⁾	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amicacina, gentamicina, ampicilina/sulbactam, imipenem, meropenem, ertapenem, polimixina/colistina, ciprofloxacino, ceftazidima, cefepime e ceftriaxona.

Isolar, identificar e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos patógenos causadores de infecções são atividades imprescindíveis no cotidiano de um laboratório de análises clínicas e são cruciais na escolha da terapia antimicrobiana. Os testes de sensibilidade foram inicialmente confeccionados a partir da metodologia de Kirby e Bauer, a partir da difusão em disco, onde se determina sensibilidade ou resistência de bactérias aos fármacos testados. A interpretação destes resultados consta nos compêndios nacionais e internacionais, junto às descrições de técnicas e lista dos antimicrobianos preconizados.^(10,11,13)

Atualmente, em muitos laboratórios são utilizados testes automatizados para diagnóstico bacteriano, principalmente em relação ao TSA, otimizando o processo analítico e dando uma resposta rápida à necessidade terapêutica.^(19,20) Na maioria dos estudos pesquisados, foram encontrados, principalmente, microrganismos Gram-negativos do grupo das enterobactérias, assim como Gram-positivos do gênero *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, conforme encontrado nos trabalhos de Lima⁽²¹⁾ e de Pontes e colaboradores.⁽¹⁸⁾

Na presente pesquisa, também foram encontrados trabalhos com Gram-negativos do grupo dos não fermentadores de glicose, principalmente com as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, como no estudo apresentado por Silva.⁽²²⁾ Entretanto, há uma carência de estudos realizados com bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), sendo encontrado apenas um trabalho, de Duo Filho e colaboradores,⁽⁴⁾ com *Mycobacterium leprae*.

Em relação aos sítios de onde foram isoladas as bactérias resistentes, o trato urinário foi presente em muitos estudos, sendo o sítio predominante.^(12,23-26) Outro sítio importante para a clínica é o cirúrgico, que pode se tornar um problema e causar efeitos deletérios no pós-procedimento, dependendo das bactérias encontradas e sua sensibilidade.⁽¹⁷⁾

A resistência bacteriana foi encontrada em diferentes níveis nos estudos incluídos nesta pesquisa, principalmente contra antimicrobianos emergentes e já consagrados na clínica, como o caso das cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, entre outros.⁽¹⁹⁾ Entre os mecanismos de resistência, podemos salientar a presença de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), assim como enterobactérias resistentes aos Carbapenêmicos (ERC), *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE).^(27,28)

Cabe salientar que não só os humanos são acometidos por infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos, pois observando o estudo realizado por Souza e colaboradores,⁽²⁹⁾ foram encontradas cepas de *Klebsiella pneumoniae* com variados perfis de resistência

em animais silvestres e domésticos. As bactérias do gênero *Klebsiella* são um grande problema em relação ao desafio de resistência, principalmente em âmbito hospitalar. Uma forma de tentar minimizar este impacto é apontada no estudo de Rocha e colaboradores,⁽³⁰⁾ que sugere a detecção precoce da presença destas bactérias, inclusive as resistentes aos carbapenêmicos, por meio de teste rápido.

Todas as técnicas laboratoriais, desde as mais convencionais até as mais modernas, fazem parte da rotina institucional, dependendo da tecnologia e dos recursos existentes, a fim de conter a disseminação de bactérias multirresistentes. O foco desta contenção são as unidades de saúde, desde os ambulatórios até as unidades de tratamento intensivo.^(19,28)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência bacteriana deriva da habilidade da população bacteriana em se adaptar às agressões sofridas ao longo da História e junto ao uso inadequado dos antimicrobianos essas condições podem causar um aumento significativo da gravidade das infecções causadas por diversas espécies.

É essencial a pesquisa e publicação nesta área de resistência, pois auxiliam e norteiam a criação e atualização de compêndios, novas tecnologias e novas condutas terapêuticas. A redução dos estudos no último ano, devido à paralisação das atividades de pesquisa no cenário pandêmico, desde março de 2020 em nosso país, afetou diretamente a produção científica e, conseqüentemente, freou o desenvolvimento neste campo. Porém, aos poucos, devemos voltar ao foco também da resistência bacteriana, a fim de conter e/ou minimizar este tão grave problema de Saúde Pública.

Abstract

Bacterial resistance mechanisms can exist intrinsically or acquired, but in both cases they can make the antimicrobial therapy recommended for the treatment of infections difficult. This article aims to present recent studies on the subject. A literature review on bacterial resistance to antimicrobials was carried out using the MEDLINE, LILACS, Scopus and Web of Science databases. The search identified a total of 16 articles, which were published between 2017 and 2021. Most articles on Gram-negatives dealt with the enterobacteria group, as well as Gram-positive articles from the Staphylococcus, Enterococcus and Streptococcus genera. Bacterial resistance was found in cephalosporins, carbapenems, quinolones, aminoglycosides, among others. Regarding resistance mechanisms, Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), Carbapenem-Resistant Enterobacteria (ERC), Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) have been reported and it is observed that most works corroborate that its tracking aims to minimize transmission in health institutions.

Keywords

Bacterial drug resistance; Bacterial Infections; Microbiology

REFERÊNCIAS

1. Da Costa ALP, Silva Junior ACS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2017; 7(2): 45-57.
2. Lima CC, Benjamim SCC, Santos RFS. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. *Cuidarte Enferm*. 2017; 8(2):105-13.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª ed. Washington: ASM Press; 2017.
4. Duo Filho VB, Belotti NCU, Paschoal VDA, Nardi SMT, Pedro HDSP. - *Mycobacterium leprae*: aspectos da resistência aos fármacos na poliquimioterapia. *Arq. Ciências saúde UNIPAR*. 2021; 25(1): 79-85.
5. Santos IAL, Nogueira JMR, Mendonça FCR. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC*. 2015; 47(1/2): 5-12.
6. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
7. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.
8. Abrantes JA, Nogueira JMR. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC*. 2017; 49(3): 240-4.
9. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica (Manual-Módulo V). Brasília; 2005.
10. BRCAS - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2019. <http://brcast.org.br>
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-29th ed. Wayne, PA, USA; 2019.
12. Curto C., Rosendo I., Santiago L. Perfil de Sensibilidade aos Antibióticos na Infecção Urinária em Ambulatório no Distrito de Coimbra: Um Estudo Transversal. *Acta Médica Portuguesa*. 2019; 32(9): 568-575.
13. EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2019. <http://www.eucast.org>
14. Nogueira JMR, Miguel LFS. Bacteriologia. IN: Amendoeira R. (Coord.). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde*. Ed. Fiocruz; 2010. V. IV, p. 221-397.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JRWC. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2018.
16. Oplustil CP. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2019.
17. Boaventura JEM, Cordeiro ALAO, Barros, CSMA, Moreira BSG, Lobo JO, Pedreira LC. Infecções de sítio cirúrgico: incidência e perfil de resistência antimicrobiana em unidade de terapia intensiva. *Rev. baiana enferm*. 2019; 33: e33595.
18. Pontes DG, Silva ITCE, Fernandes JJ, Monteiro AFG, Gomes PHS, Ferreira MGM, Lima FG, Correia JO, Santos NJN, Cavalcante LP. Microbiologic characteristics and antibiotic resistance rates of diabetic foot infections. *Rev Col Bras*. 2020; 47.
19. Mota FS, Oliveira HA Souto RCF. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. *Rev. bras. anal. Clin*. 2018; 50(3): 270-277.
20. Oliveira WV, Santos WS, Gomes BS, Lima JLC. Etiologia e perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014. *Rev. bras. anal. Clin*. 2019; 51(1): 40-45.
21. Lima KZ. Epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde por bactérias multidroga resistentes em um hospital de médio porte do Vale do Paraíba. São Paulo [dissertação]. São José dos Campos; 2019.
22. Silva ED. Incidência de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, em amostras clínicas de pacientes atendidos em um Hospital Universitário. Ribeirão Preto [dissertação]; 2017.
23. Carneiro AA, Ferreira AP, Garcia PG. Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de urina em um hospital do sudeste de Minas Gerais. *Rev. bras. anal. clin*. 2018; 50(2): 135-138.
24. Pancotto C, Lovison OVA, Cattani F. 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. *Rev. bras. anal. Clin*. 2019; 51(1): 29-33.
25. Póvoa CP, Silva RC, Santos KC; Souza ACSE, Pereira MS, Carmo Filho JR. Evolução da resistência bacteriana em infecção comunitária do trato urinário em idosos. *Rev. Epidemiol. Controle Infecç*. 2019; 9(1): 8-14.
26. Ferreira VM, Rossiter LNV Aragão NFF, Pinto OA, Santos PM, Cardoso PHA, Cerqueira TB, Fernandino DM, Rocha GM. Infecções comunitárias do trato urinário e do manejo. *Rev. bras. med. fam. Comunidade*. 2017; 12(39): 1-13.
27. Atilano Carvalho P, Monteiro A, Almeida B, Correia FH, Resende V, Nunes C, Lopes S. The Epidemiological Profile of the Isolation "Problem" Microorganisms. *Acta Med Port*. 2019; 32(9): 600-605.
28. Mello MS. Ações para a prevenção e controle da resistência bacteriana em hospitais de grande porte de Minas Gerais. [Dissertação] Belo Horizonte; 2019.
29. Sousa ATHI, Makino H, Bruno VCM, Candido SL, Nogueira BS Menezes IG, Nakazato L, Dutra V. Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres. *Arq. bras. med. vet. zootec*. (Online). 2019; 71(2): 584-593.
30. Rocha, HAL, Rocha SGMO, Alcantara ACC, Façanha MC. Custo-efetividade de teste rápido de detecção de *Klebsiella* spp. para rastreamento hospitalar. *J. bras. econ. saúde (Impr.)*. 2019; 11(3): 213-220.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Laboratório de Microbiologia

Departamento e Ciências Biológicas

Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos

Rio de Janeiro-RJ, Brasil

E-mail: joselimaria@gmail.com

Controle da qualidade em Citopatologia: A importância da fase pré-analítica

Quality control in Cytopathology: The importance of the pre-analytical phase

Giovanna Ferreira Alencar¹

Ivanna Maria Costa de Araujo¹

Lethicia Victoria Gomes da Costa¹

Nataly Barros Trajano¹

Maria Lucia Uttagawa²

Resumo

O exame citopatológico tem sido utilizado para rastreamento de câncer desde a década de 1940. O exame apresenta uma variação grande com relação à sensibilidade devido a vários fatores provocados durante o processo da fase pré-analítica. O estudo se baseia em uma revisão sistemática, onde os autores fizeram uma investigação sobre o tema, com a finalidade de identificar, selecionar, avaliar e sintetizar as evidências relevantes disponíveis. A busca dos artigos científicos foi realizada por meio de buscas nas bases de dados eletrônica Literatura Latino-Americana em Ciência e Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Library of Medicine, Estados Unidos (MEDLINE). O objetivo deste estudo foi levantar os principais pontos da fase pré-analítica que podem impactar no resultado do exame de citopatologia e identificar os impactos gerados pela negligência do controle de qualidade analítico e as consequências geradas. Ao estudar a fase pré-analítica na citologia oncológica, entende-se a relevância da qualidade inicial, para o melhor resultado ao paciente. Todos os sistemas de avaliação de desempenho em laboratórios de citopatologia coincidem na necessidade de um programa de controle interno da qualidade perfeitamente estabelecido e executado, podendo obter resultados mais confiáveis.

Palavras-chave

Controle da Qualidade; Colo do útero; Citopatologia

INTRODUÇÃO

O exame Papanicolaou, surgiu a partir dos estudos de George N. Papanicolaou em 1928, onde estudava as mudanças provocadas pelos hormônios uterinos e suas secreções. Foi na década de 1940, que o exame de colpocitopatologia oncológica se tornou um dos procedimentos clínicos mais importantes, tanto pela sua grande aplicabilidade no diagnóstico de doenças, e especialmente na detecção de lesões cancerosas, quanto pela sua capacidade de detectar lesões pré-neoplásicas do colo do útero ainda em fase inicial.

⁽¹⁾ Segundo estudos, o câncer de colo uterino é a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. O principal responsável é a infecção persistente por alguns tipos do papilomavírus humano. Os tipos HPV-16 e o HPV-18 são responsáveis por cerca de 70% dos cânceres cervicais.⁽²⁾

Esta infecção provoca alterações celulares que podem ser identificadas no exame de citologia oncológica e são curáveis na quase totalidade dos casos quando diagnosticados precocemente. Por isso a importância da realização de exames periódicos.^(3,4)

Além de aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV, outros fatores ligados à imunidade, à genética, comportamento sexual, tabagismo, uso de contraceptivos orais são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de câncer do colo uterino.^(5,6,7) A citologia oncológica ou colpocitopatologia visa analisar as células de forma individualizada, intervindo na detecção de células anormais, assim como para a prevenção secundária nos estágios iniciais do câncer do colo uterino. Atualmente, a Nomenclatura Brasileira de Citopatologia se classifica em negativo para malignidade e anormalidades epiteliais

¹ Graduanda em Biomedicina da Universidade Anhembi Morumbi. São Paulo, SP, Brasil.

² Docente da Universidade Anhembi Morumbi. São Paulo, SP, Brasil.

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi. São Paulo, SP, Brasil.

Recebido em 26/06/2020

Aprovado em 28/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.202202025

escamosas, atípicas em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US), atípicas em células escamosas de significado indeterminado em que não é possível descartar lesão intraepitelial escamosa de alto grau (ASC-H), lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), carcinoma escamoso e anormalidades epiteliais glandulares em adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor. Para comprovar a eficiência do exame e sua importante aplicação, ele deve ser realizado periodicamente, assim como recomendado por organizações nacionais e internacionais de Saúde, para as mulheres que já tenham iniciado a atividade sexual.^(8,9,10)

A garantia da qualidade do exame se dá pela excelência da fase pré-analítica. Uma boa amostra clínica deve ser: identificada corretamente; ser coletada no local e no período correto; ter a quantidade suficiente para análise e ser armazenada em recipiente adequado. Todos os processos operacionais são eficazes se forem feitos de maneira segura, pois as maravilhas tecnológicas têm criado para os pacientes uma expectativa de perfeição, mas não podemos esquecer que trarão consigo novas formas de erros.^(11,12)

É essencial a coleta de material direto do colo do útero, para se obter uma amostra adequada, coletando células do epitélio escamoso e glandular. A presença das células endocervicais e metaplásicas são consideradas indicadores importantes da qualidade da amostra. Quando não há representatividade desses dois tipos de células sugere-se a inadequabilidade da amostra do local ou ausência de células da endocérvice no material coletado.⁽¹³⁾

O processo de fixação do material é uma etapa importante para a preservação da qualidade da amostra. Quando há um tempo considerável entre a coleta e a sua fixação, podem ocorrer mudanças nucleares e citoplasmáticas que comprometem a coloração das células.^(14,15)

O objetivo deste estudo é levantar os principais pontos da fase pré-analítica que podem impactar no resultado do exame de citopatologia e identificar os impactos gerados pela negligência do controle da qualidade analítico e as consequências geradas.

METODOLOGIA

O estudo se baseia em uma revisão sistemática, onde os autores fizeram uma investigação sobre o tema com a finalidade de identificar, selecionar, avaliar e sintetizar as evidências relevantes disponíveis. A busca de artigos científicos foi realizada por meio de buscas nas bases de dados eletrônicas Literatura Latino-Americana em Ciência e Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Library of Medicine, (MEDLINE).

Para tanto, foram aplicados como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) os seguintes: fase pré-analítica, colpocitologia, gestão da qualidade, erros pré-analíticos.

DESENVOLVIMENTO

Coloração de Papanicolaou

O procedimento de coloração de Papanicolaou baseia-se no conjunto de ações dos corantes: o corante básico (Hematoxilina), o corante ácido (Orange G) e o corante policromático (EA-65). Neste método ocorrem etapas de hidratação, coloração e desidratação da lâmina, a fim de evidenciar variabilidade na morfologia, nos graus de maturidade e de atividade metabólica da célula.¹⁶

Uma simples variação, como a composição química da água corrente, pH da amostra e número de lâminas coradas por um mesmo lote, pode contaminar ou afetar o equilíbrio entre as diferentes tonalidades de cores produzidas pelos corantes. Para evitar a contaminação dos corantes utilizados nesta etapa, é indispensável passar por um controle da qualidade diário, que pode ser monitorado por meio da análise microscópica. Estas medidas de ações preventivas devem ser registradas e implementadas, a fim de aprimorar a qualidade da técnica.^(10,16)

Os esfregaços corados devem ser montados de forma efetiva, utilizando-se um meio de montagem que permite a ligação entre lâmina e lamínula. O meio de montagem age como um selador, protegendo contra o desbotamento do corante e manutenção da amostra. Assim, a montagem com lamínula é uma técnica obrigatória, pois proporciona melhor visualização das células, preservando as estruturas contra danificação mecânica e artefatos de secagem ao ar. Porém, alguns laboratórios de citopatologia adotam o verniz como método de montagem por apresentar baixo custo e simplicidade. Por outro lado, sua desvantagem seria, nos processos de remontagem/recoloração, a de que muitas vezes pode impossibilitar a releitura das lâminas. Portanto, uma lâmina bem preparada é primordial para a análise e, conseqüentemente, para discussão futura dos resultados.⁽¹⁶⁾

Além disso, a ausência de lamínula impulsiona a perda da coloração celular, resultando na diminuição da qualidade durante o período de arquivamento. Para obter-se uma boa qualidade no processo de montagem da lâmina citológica, deve-se evitar excesso de meio de montagem e aparecimento de eventuais bolhas que prejudicam a análise citológica. Por fim, a lâmina com a lamínula aderida deve cobrir toda a superfície do esfregaço para sua secagem adequada.⁽¹⁷⁾

Critério de aceitação e rejeição da amostra

Os critérios de rejeição da amostra se referem àqueles casos com dados ilegíveis na identificação da amostra; falta de identificação ou identificação incorreta da amostra; ausência de dados referentes à anamnese e ao exame clínico; ausência de identificação do profissional responsável pela coleta e registro no respectivo conselho de classe; ausência do nome do Serviço de Saúde responsável pela coleta; divergência entre as informações da requisição e da

lâmina; lâminas quebradas; material sem fixação prévia; uso de fixador inadequado e quantidade ineficiente de fixador.⁽¹⁷⁾

A rejeição da amostra ocorre na triagem do laboratório. Esta ação deve ser comunicada à unidade que fez a coleta da amostra para realizar nova coleta. Isto será fundamental para que se possa realizar ações de melhoria.⁽¹¹⁾

O relato da rejeição da amostra é um procedimento fundamental e deve ser ressaltado ainda que a rejeição de um material significa um gasto sem resultado e que todo o esforço da mulher para realizar o exame foi perdido.⁽¹⁸⁾

Controle da qualidade e educação continuada

O laboratório deve ter critério padronizado de controle da qualidade interno em todas as fases do processo de realização do exame: recepção, coleta, transporte da amostra, técnica de coloração, análise e emissão de laudo.^(11,16)

A qualidade do esfregaço citológico está diretamente relacionada ao desempenho dos recursos humanos envolvidos. Assim, é de suma importância a participação dos profissionais da saúde em cursos de capacitação, qualificação e em programas de educação continuada, para garantia da boa qualidade dos exames citológicos.⁽¹⁷⁾

Um dos fatores que também podem prejudicar o resultado do exame é a falta de preenchimento ou preenchimento incompleto das fichas de requisição. As justificativas para esta falta de informações na ficha foi a sobrecarga do profissional e a falta de informação sobre a importância desta. A proposta de melhoria seria oferecer aprimoramento, educação continuada e conscientização dos profissionais envolvidos nesta fase pré-analítica, o que pode melhorar a qualidade do resultado do exame.^(19,20)

Amostragem

Erros de coleta podem variar de 20% a 68%, ocasionando altos índices de resultados falsos negativos. Este procedimento depende da habilidade dos profissionais que efetuam a coleta para obter amostras satisfatórias.^(21,22)

Um outro fator muito importante é informar a paciente sobre as normas de procedimento para coleta do exame citopatológico, como estar fora do período menstrual, abstinência sexual de pelo menos 48 horas e não ter feito uso de cremes vaginais. As informações clínicas, como data da última menstruação, uso de contraceptivo, reposição hormonal, antecedentes de rádio e/ou quimioterapia, histerectomia, também ajudam bastante o citologista na hora da análise.⁽¹¹⁾

Os casos com a informação de amostras de mulheres que realizaram histerectomia, pós-radioterapia ou pós-quimioterapia apresentaram altas taxas de diagnóstico insatisfatório com a justificativa de baixa celularidade escamosa.⁽²³⁾

Para esta situação de amostras insatisfatórias o consenso da Sociedade Americana para Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP) recomenda a colposcopia para mulher

que apresentou dois resultados insatisfatórios consecutivos. E para mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, o teste HR-HPV é recomendado nos casos de citologia negativa com ausência da zona de transformação.⁽²⁴⁾

Importância da fase pré-analítica

A fase pré-analítica é um componente importante no processo de operações laboratoriais, porque existem diversos fatores que afetam o resultado do paciente.

Esta fase compreende desde o preenchimento da requisição do exame até a análise do esfregaço. Nesta fase, dois estágios podem ser analisados, um externo e outro interlaboratorial. A unidade coletora tem um papel bastante importante, pois depende da amostra coletada do local correto. O indicador para esta etapa seria a amostragem com representatividade das células representativas da junção escamo-colunar.⁽¹³⁾

Vários estudos têm demonstrado que a adequabilidade da amostra não está presente em grande parte das amostras. Cerca de 40,73% dos esfregaços não têm representação da junção escamo-colunar, o que poderia ser um fator que pode comprometer a qualidade do exame, levando a um resultado falso negativo.^(19,25)

O erro interlaboratorial ocorre quando a triagem não foi bem realizada. Às vezes, a grande quantidade de amostras para serem triadas pode levar a falhas neste processo. Para minimizar estas falhas é necessário que haja um treinamento e um acompanhamento destes profissionais. O acompanhamento da qualidade das amostras pode ser realizado por indicadores de qualidade. As variações na sensibilidade e especificidade são observadas por diversos fatores cuja mensuração muitas vezes é difícil, pois alguns são revelados na fase analítica e outros não serão evidentes.⁽²⁶⁾

As condições inadequadas de trabalho, qualidade das amostras e o preenchimento da ficha de requisição incompleta, com falta de informações clínicas pode comprometer a qualidade do exame citopatológico.^(19,27)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao estudar a fase pré-analítica na citologia oncológica, entende-se a relevância da qualidade inicial, que é de extrema importância para o resultado final. Todos os sistemas de avaliação de desempenho em laboratórios de citopatologia devem preservar a necessidade de um programa de controle interno da qualidade perfeitamente estabelecido e executado. Os treinamentos e educação continuada são medidas necessárias para minimizar os erros na fase pré-analítica. Além destas ações com os profissionais que já estão atuando não podemos esquecer que as unidades de coleta apresentam uma grande rotatividade desses profissionais. E toda vez que houver mudanças nos protocolos todos deverão passar por um treinamento.

Abstract

The cytopathological exam has been used for cancer screening since the 1940s. The exam has a wide variation in sensitivity due to several factors caused during the process of the pre-analytical phase. The study is based on a systematic review, where the authors conducted an investigation on the topic, with the purpose of identifying, selecting, evaluating and synthesizing the relevant evidence available. The search for scientific articles was carried out by searching the electronic databases Latin American Literature on Science and Health (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Library of Medicine, States States (MEDLINE). The objective of this study was to raise the main points of the pre-analytical phase that can impact the result of the cytopathology exam and to identify the impacts generated by the neglect of the analytical quality control and the consequences generated. When studying the pre-analytical phase in oncotic cytology, the relevance of the initial quality is understood, for the best result to the patient. All performance evaluation systems in cytopathology laboratories coincide with the need for a perfectly established and executed internal quality control program, which can obtain more reliable results.

Keywords

Quality Control; Cervix Uteri; Citopathology

REFERÊNCIAS

1. Neufeld PM. Personagem da História da Saúde VI: George Nicholas Papanicolaou. RBAC. 2019;51(2):94-7.
2. Bruni L et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report, 17 June 2019.
3. BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Plano de ação para redução da incidência e mortalidade por câncer do colo do útero: sumário executivo. Rio de Janeiro: INCA, 2010. 40 p.
4. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2019.
5. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. International journal of cancer, Genève, 2006;118(6):1481-95.
6. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. The Lancet, Boston, 2007;370, n. 9599,1609-21.
7. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, Philadelphia, 2009;18(4):1060-69.
8. BRASIL. Ministério da Saúde: Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
9. Nayar R, Wilbur DC. Sistema Bethesda para relato de citologia cervical. Tradução de Samantha Abreu, 3ªEd. – São Paulo: Livromed, 2018.
10. INCA. Instituto Nacional de Câncer: Nomenclatura Brasileira de Laudos Citopatológicos Cervicais. 3ªed. Rio de Janeiro, 2012.
11. Consolaro MEL, Maria-Engler SS – Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas– São Paulo: Roca, 2016; in Amaral RG & Palhano, RMAB: Controle de qualidade, 221-35.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC n. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre requisitos para o funcionamento dos laboratórios clínicos e postos de coleta laboratorial públicos ou privados que realizam atividades na área de análises clínicas, patologia clínica e citologia.
13. Shirata NK et al. Celularidade dos esfregaços cervicovaginais: importância em programas de garantia da qualidade em citologia. J. Bras. Ginec, 1998; 108(3):63-6.
14. INCA. Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio a Organização de Rede. – 2. ed. rev. ampl. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
15. Manrique EC et al. Factors that compromise the adequacy of cytological cervical sample. FEMINA, maio 2009, 37(5).
16. Silva G.F, Cristovam PC, Vidotti DB. O impacto da fase pré-analítica na qualidade dos esfregaços cervicovaginais. RBAC. 2017, 49(2):135-40.
17. BRASIL. Ministério da Saúde-Portaria nº 3.388, 27 de dezembro de 2013: Redefine a Qualificação Nacional em Citopatologia na prevenção do câncer do colo do útero (QualiCito), no âmbito da Rede de Atenção à Saúde das Pessoas com Doenças Crônicas.
18. Miller AB et al. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. International Journal of Cancer, New York, 2000, 86(3):440-47.
19. Amaral RG et al. Fatores que podem comprometer a qualidade dos exames citopatológicos no rastreamento do câncer do colo do útero. RBAC, 2006, 38(1):3-6.
20. Koss LG, Gompel C. Introdução à citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas. São Paulo: Roca, 2006.
21. Gay JD, Donaldson LD, Goellher JR. False negative results in cervical cytologic studies. Acta cytologica, 1985, 29:1043-46.
22. Bonini P, et al. Errors in laboratory medicine. Clin. Chem., 2002, 48:691-98.
23. Gupta S, et al. Clinical determinants and smear characteristics of unsatisfactory conventional cervicovaginal smears. Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol., 2013, 168: 214-17.
24. Massad LS, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. J.Low Genit Tract Dis. 2013, 17:S1-27.
25. Rabelo SP, et al - Principais causas que limitam ou tornam as amostras insatisfatórias que podem comprometer a análise dos exames citopatológicos no rastreamento do câncer do colo do útero. Rev Eletronica de Farmácia, 2005, 2(2):190-3.
26. Donayre PC, Zeballos EH, Sánchez JB - Realidad de la fase pre-analítica en el laboratorio clínico. Peru. Rev Med Hered; 2013, 24(4):325-26.
27. Plewka J, et al. Avaliação dos indicadores de qualidade de laboratórios de Citopatologia cervical. Rev Inst Adolfo Lutz, 2014, 73(2):140-7.

Correspondência

Maria Lucia Utagawa

R. Dr. Almeida Lima, 1134 Mooca-SP

CEP 03164-000

E-mail: mutagawa@hotmail.com

Expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 na lesão intraepitelial cervical de alto grau: revisão de estudos

Immunohistochemical expression of biomarkers p16 and Ki-67 in high-grade cervical intraepithelial lesion: review of studies

Cesar Augusto Ferreira de Melo¹

Maria Lucia Utagawa²

Resumo

O câncer do colo do útero é o quarto tumor mais comum entre mulheres no mundo e o terceiro no Brasil. A detecção precoce e a identificação das lesões cervicais são essenciais no rastreamento do câncer cervical. Nos últimos anos, vários marcadores têm sido apresentados como possíveis candidatos para a triagem eficiente de exames citológicos com anormalidades das células epiteliais. O objetivo deste trabalho é analisar a correlação com a expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 com lesão intraepitelial cervical de alto grau na detecção molecular DNA/HPV de alto risco. A metodologia de pesquisa empregada é uma revisão sistemática, realizada por meio de buscas nas bases de dados eletrônica Literatura Latino-Americana em Ciência e Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Library of Medicine (MEDLINE) de artigos publicados no período de 2005 a 2019 nos idiomas português, inglês e espanhol. Concluiu-se que o uso das proteínas p16 e Ki67 auxilia na identificação das mudanças que acontecem durante a progressão da lesão cervical, aprimorando os métodos de rastreio atuais. O gene p53, a pRb e ciclinas também têm um papel crítico na carcinogênese e, desta maneira, também têm sido indicados para entrar nos painéis de estudo.

Palavras-chave

Neoplasia Intraepitelial Cervical; Neoplasias do Colo do Útero; Biomarcadores; Infecções por *Papillomavirus*

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o quarto tumor mais comum entre mulheres no mundo e o terceiro no Brasil, atingindo predominantemente populações de baixa renda, sendo que o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical é a infecção persistente pelo Papilomavírus humano de alto risco (HR-HPV) oncogênico.^(1,2)

A história natural do desenvolvimento do câncer do colo uterino está intimamente associada à infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV) dos tipos carcinogênicos, a qual representa a infecção sexualmente transmissível mais prevalente no mundo. Habitualmente, a infecção pelo HPV ocorre mais frequentemente entre mulheres jovens, com vida sexual ativa, múltiplos parceiros sexuais e possui pico de incidência poucos anos após o início da atividade sexual.^(3,4)

O desenvolvimento do câncer do colo uterino é resultado da progressão de lesões precursoras. A maioria das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), especialmente as de grau 1, tende a regredir naturalmente, porém temos lesões que podem progredir para o câncer ao longo do tempo. O surgimento das NIC ocorre geralmente em mulheres jovens, em torno dos 30 anos, porém têm uma progressão lenta, podendo levar anos para chegar até a doença invasiva.⁽⁵⁾

Portanto, mulheres mais velhas têm um risco maior de apresentar o câncer de colo uterino. O longo intervalo entre a lesão precursora e o surgimento do câncer permite o rastreamento e prevenção dessa doença. Vários estudos já têm demonstrado que o principal fator para o desenvolvimento das NIC e do câncer do colo uterino é a infecção persistente pelos tipos oncogênicos do HPV.⁽⁶⁾

¹ Graduando em Biomedicina da Universidade Anhembi Morumbi.

² Docente da Universidade Anhembi Morumbi.

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi. São Paulo, SP, Brasil.

Recebido em 02/07/2020

Aprovado em 12/08/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202202030

O HPV pertence à família Papillomaviridae, gênero *Papillomavirus*. São vírus não envelopados e com DNA de dupla fita circular e cerca de 8.000 pares de bases. Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados e cerca de 40 tipos infectam o trato genital feminino.⁽⁶⁾

A detecção precoce e a identificação das lesões cervicais são os objetivos centrais do rastreamento do câncer cervical e está fundamentada em três exames: Citopatologia ginecológica, colposcopia e biópsia. A biópsia é considerada o “padrão-ouro” para identificação das lesões.⁽⁷⁾

No entanto, dificuldades têm sido relatadas pelos patologistas no diagnóstico diferencial das NIC com o uso dessa metodologia, principalmente na transição de NIC2 para NIC3, o que destaca a necessidade de buscar biomarcadores específicos que minimizem a discordância entre os analistas, auxiliando na classificação das lesões e na identificação precoce da doença cervical. Estes biomarcadores contribuem para fornecer evidências da persistência da infecção pelo HPV e da ativação de suas proteínas oncogênicas virais.^(7,8)

Atualmente os biomarcadores mais estudados são p16, ProExC, que atuam no ciclo celular, e o Ki-67, um marcador de proliferação celular. A coexpressão dessas duas moléculas sugere uma desregulação do ciclo celular mediada pela infecção do HPV de alto risco. Estudos têm mostrado a importância da coloração dupla p16/Ki-67 na triagem e rastreamento de câncer cervical e lesões pré cancerosas.⁽⁹⁾

Este estudo tem por objetivo analisar a correlação com a expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 com lesão intraepitelial cervical de alto grau na detecção molecular DNA/HPV de alto risco.

METODOLOGIA

Visando alcançar resposta ao objetivo enunciado, considerou-se pertinente a realização de uma revisão sistemática, por permitir a síntese do estado do conhecimento de um determinado assunto, permitindo a compilação de vários estudos publicados em um período, o que facilita alcançar informações conclusivas relevantes. O levantamento bibliográfico foi realizado por meio de buscas informatizadas nas bases de dados eletrônica Literatura Latino-Americana em Ciência e Saúde (LILACS), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), *National Library of Medicine*, Estados Unidos (MEDLINE).

Para tanto, foram aplicados como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) os seguintes: neoplasia intraepitelial cervical, neoplasia do colo do útero, biomarcadores, infecções por papilomavírus. Os critérios de inclusão foram: artigos publicados no período de 2005a 2019, a fim de garantir informações atualizadas, redigidos nos idiomas português, inglês e espanhol; artigos científicos originais e de revisão que respondam ao objetivo proposto. E como critérios

de exclusão foram estipulados os seguintes: ausência de resumos nas plataformas de busca online; indisponibilidade de acesso na íntegra e demais tipos de publicações, como anais de congressos e editoriais.

Para o levantamento dos artigos foram realizadas três etapas de leitura minuciosa. Assim, a princípio os estudos que não atenderam aos critérios de inclusão foram excluídos. Na primeira leitura, se enfatizou o título e o resumo dos artigos, na segunda leitura, deu-se ênfase ao método, resultados e conclusões e, por fim, na última etapa, ocorreu a leitura na íntegra.

DESENVOLVIMENTO

Nos últimos anos, os biomarcadores têm sido muito estudados para colaborar na identificação de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau. Já há um consenso que estes biomarcadores podem ser incorporados na prática da histopatologia a fim de aumentar a sensibilidade na detecção de lesão de alto grau em biópsias.⁽⁹⁾

Uma série de proteínas tem sido relacionada a mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical e vem sendo proposta como possíveis biomarcadores da doença, dentre estas destacam-se a proteína supressora de tumor p16^{INK4a} e o marcador de proliferação celular Ki-67, p53, pRb.^(9,10)

As oncoproteínas críticas do HPV envolvidas no processo da carcinogênese são as oncoproteínas virais E6 e E7. A proteína viral E6 se liga e inativa a proteína p53 e desregula o ciclo celular bloqueando o processo de apoptose, fazendo com que as células infectadas percam o controle, proliferando de forma desordenada. A pRb é desativada pela oncoproteína E7, liberando o E2F ativado que informa a continuação do ciclo celular. Isso induz à expressão aumentada de p16 que tenta bloquear o ciclo, mas o feedback não funciona, porque a proliferação das células infectadas não depende da Ciclina D/Cdk4/6, causando então acúmulo de p16 na célula.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Muitos estudos recentes têm verificado a importância e a positividade do imunomarcador da p16 e do p53 nas NIC. Fonseca et al. (2016), em seus estudos, demonstram que a expressão imuno-histoquímica de p53 e p16 evidencia fortemente a relação de gravidade da infecção do HPV com o desenvolvimento da NIC, mas que não podem ser considerados marcadores capazes de prever a recorrência da doença após tratamento por conização.^(9,13-17)

Estudos tem demonstrado que, as células resultantes de mutação pela ação das oncoproteínas virais podem se multiplicar descontroladamente e levar ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de colo uterino e, dessas, evoluírem para o câncer.^(6,18)

O antígeno de proliferação Ki-67 é expresso durante as fases G2 e M do ciclo celular e tem demonstrado ser confiável para medir a gravidade das lesões NIC. Além

disso, sua associação com p16 pode melhorar a acurácia diagnóstica das lesões cervicais e indicar desregulação do ciclo celular.^(15,19)

Além do Ki-67, outro marcador que tem sido avaliado por sua capacidade de medir a fração de células em proliferação é a Proteína Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). A expressão de PCNA também está associada à replicação e ao reparo do DNA podendo variar com a gravidade e progressão da neoplasia cervical.^(20,21)

Até o momento, a proteína supressora tumoral p16 e o antígeno de proliferação celular Ki-67 são os marcadores mais extensivamente investigados pela maioria das pesquisas.⁽¹⁶⁾

Estudos de Yonamine et al. (2009) concluíram que o uso isolado do biomarcador da proteína p16 não é fator prognóstico de NIC persistente. Entretanto, na dupla coloração, a superexpressão de p16 e expressão de Ki-67 em situações fisiológicas são independentes e não ocorrem simultaneamente na mesma célula epitelial cervical. Porém, a coexpressão de p16 / Ki-67 implica desregulação do ciclo celular induzido por HR-HPV e a detecção da coexpressão pode servir como um marcador para prever a transformação celular por HR-HPV e a presença das lesões de NIC de alto grau.^(22,23)

A dupla coloração de p16 / Ki-67 demonstrou uma boa sensibilidade e especificidade na NIC, a coexpressão foi expressa em 86,20% e no carcinoma em 95,23%, enquanto nos casos de cervicite crônica não houve expressão de p16 e Ki-67 em 100%.⁽²⁴⁾

A forte e difusa expressão citoplasmática e nuclear de p16 no colo do útero é predominantemente associada à infecção por HR-HPV. A superexpressão de p16 é observada na maioria dos cânceres cervicais. O padrão de imunomarcagem de p16 e Ki-67 teve relação com as categorias diagnósticas de NIC realizadas em Hematoxilina-eosina, tendendo a ser positivo e difuso em mais de 1/3 do epitélio para p16 e positivo difuso ou multifocal em pelo menos 1/3 do epitélio para Ki-67 nas lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3) e câncer.⁽²⁴⁻²⁶⁾

CONCLUSÃO

A proposta do estudo foi alcançada, visto que foi possível destacar a relevância dos biomarcadores para diagnóstico de câncer do colo de útero, buscando avaliar a infecção do HPV por meio da expressão desses marcadores em dupla coloração nos casos onde há dúvidas de interpretação e ajudar no diagnóstico e prognóstico das lesões intraepiteliais cervicais na detecção molecular DNA/HPV de alto risco.⁽²³⁾

Há evidências crescentes de que a dupla coloração p16/Ki-67 pode ser usada como boa alternativa na triagem e rastreamento de câncer cervical e lesões pré-cancerosas, mostrando alta sensibilidade e especificidade.⁽²⁴⁾

O uso das proteínas p16 e Ki67 pode melhorar o desempenho dos testes de detecção das lesões pré-cancerosas e auxiliar na identificação das mudanças que acontecem durante a progressão da lesão cervical, aprimorando os métodos de rastreio atuais.⁽¹⁶⁾

O gene p53 tem sido extensivamente estudado nas neoplasias, mostrando que pacientes com mutações apresentam pior prognóstico. Estudos realizados por Fonseca et al. (2016) concluíram que a expressão imuno-histoquímica de p53 e p16 apresentou baixa sensibilidade e baixa especificidade como marcadores capazes de prever a recorrência da NIC de alto grau tratada por conização. Contudo, a maioria dos estudos consegue identificar uma relação direta entre o percentual de positividade da expressão destes marcadores com a gravidade da doença. Porém, não existem dúvidas de que o gene p53 tem um papel crítico na carcinogênese. Desta maneira, os biomarcadores moleculares p53, pRb e ciclinas também têm sido indicados para entrar nos painéis de estudo.^(13,17,18,27)

Vários estudos ainda devem ser realizados para identificar o melhor marcador para determinar o risco de desenvolvimento da doença e o prognóstico, para o sucesso do tratamento.

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common tumor among women in the world and the third in Brazil. Early detection and identification of cervical lesions are essential in screening for cervical cancer. In recent years, several markers have been presented as possible candidates for efficient screening of cytological exams with abnormalities of epithelial cells. The objective of this work is to analyze the correlation with the immunohistochemical expression of the biomarkers p16 and ki-67 with high-grade cervical intraepithelial lesion in high-risk DNA / HPV molecular detection. The research methodology employed is a systematic review, carried out by searching the electronic databases Latin American Literature in Science and Health (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Library of Medicine (MEDLINE) of published articles from 2005 to 2019 in Portuguese, English and Spanish. It was concluded that the use of proteins p16 and Ki67, help to identify the changes that happen during the progression of the cervical lesion, improving the current screening methods. The p53 gene, the retinoblastoma protein - pRb and cyclins also plays a critical role in carcinogenesis and thus, they have also been indicated to enter the study panels.

Keywords

Cervical Intraepithelial Neoplasm; Uterine Cervical Neoplasms; Biomarkers; Papillomavirus Infections

REFERÊNCIAS

1. Ferlay, J. et al Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. IARC, 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 19 nov. 2019.
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
3. Burchell ANW. et al. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 2006;24, S52-S61.
4. Dunne EF. et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, 2007;297(8) 813-9.

5. Ayres ARG, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Pública*, 2010;44(5) 963-74.
6. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents: a review of human carcinogens, v. 100B. Lyon, France: IARC Press;2012.
7. Martin CM, O'leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011;25(5) 605-15.
8. Galgano MT, et al. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2010;34(8),1077-87.
9. Nayar R, WilbuR DC. Sistema Bethesda para relato de citologia cervical. Tradução de Samantha Abreu, 3º ed., São Paulo: Livromed, 2018.
10. Cheah P, et al. Correlation of p16INK4a immunorexpression and human papillomavirus (HPV) detected by in-situ hybridization in cervical squamous neoplasia. *Malaysian J Pathol*, 2016;38(1),33-8.
11. Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*, 2012;6(2), e17.
12. Souto R, Falhari JPB, Cruz ADCL. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2005;51(2),155-60.
13. Zhou R, et al. The prognostic value of p53 expression for patients with cervical cancer: a metaanalysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2015: 195, 210-13.
14. Silva DC, et al. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. *Pathology - Research and Practice*, 2017;213(7),723-29.
15. Mitildzans A, et al. Expression of p63, p53 and ki-67 in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Turkish Journal of Pathology*, 2016:9-16.
16. Yonamine PTK, et al. Associação entre a expressão de p16 e neoplasia intra-epitelial cervical. *Arq Ciênc Saúde*, 2009out-dez;16(4),161-5.
17. Fonseca FV, et al. O papel da expressão imunoistoquímica do P16INK4a e do P53 na predição da recorrência da nic-ag após tratamento por conização. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2016; 43(1): 035-041.
18. Nicol AF, Golub JE, E Silva JRL, Cunha CB, Amaro-Filho SM, Oliveira NS, et al. An evaluation of p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia specimens, including women with HIV-1. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012;107(5):571-77.
19. Van Zummeren M. et al. Three-tiered score for Ki-67 and p16ink4a improves accuracy and reproducibility of grading CIN lesions. *Journal of Clinical Pathology*, 2018;71(11),981-88.
20. Calil LN et al. P16INK4a and Ki-67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathology - Research and Practice*, 2014: 210(8),482-487.
21. Kim TH. et al. Clinical Implication of p16, Ki-67, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cervical Neoplasia: Improvement of Diagnostic Accuracy for High-grade Squamous Intraepithelial Lesion and Prediction of Resection Margin Involvement on Conization Specimen. *Journal of Cancer Prevention*, 2015;20(1),70-7.
22. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, Von Knebel DM, Arbyn M. P16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens a systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*, 2014;142,767-72.
23. Sangwaiya A, Gill M, Bairwa S, Chaudhry M, Sen R, Prakash KS. Utility of P16/INK4a and Ki-67 in Preneoplastic and Neoplastic Lesions of Cervix. *Iran J Pathol*, 2018: 13(3),308-16.
24. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer*, 2019;10(12),2654-60; doi: 10.7150/jca.32743; disponível em <http://www.jcancer.org/v10p2654.htm>
25. Von Keyserling H, Kuhn W, Schneider A, Bergmann T, Kaufmann AM. P16INK(4)a and p14ARF mRNA expression in Pap smears is age-related. *Mod Pathol*. 2012;25:465–70.
26. Melo FL, Lancellotti CL, Silva MA. Expression of the Immunohistochemical Markers p16 and Ki-67 and Their Usefulness in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasms. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016;38(2) 82-7.
27. Mello PBS. O uso dos biomarcadores p16 e Ki67 em citologia cérvico-vaginal: revisão de estudos. *RBAC* 2011;43(3) 251-3.

Correspondência

Maria Lucia Utagawa

R. Dr. Almeida Lima, 1134 Mooca-SP

CEP 03164-000

E-mail: mutagawa@hotmail.com

Avanços e perspectivas no diagnóstico molecular da leucemia mieloide aguda: revisão sistemática

Advances and perspectives in the molecular diagnosis of acute myeloid leukemia: systematic review

Flávia Martins da Silva¹

Rogério Reis Conceição²

Resumo

Introdução: A leucemia mieloide aguda (LMA) é um distúrbio clonal maligno geneticamente heterogêneo do sistema hematopoiético, caracterizado pela proliferação descontrolada de células blásticas anormais e imaturas e produção prejudicada de células sanguíneas normais. **Objetivo:** Apresentar os avanços no diagnóstico na leucemia mieloide aguda através das técnicas de biologia molecular. **Metodologia:** A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas para artigos científicos do portal de buscas PubMed, NCBI, BVSM, também SciELO. Resultados: Técnicas moleculares, incluindo PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), PCR digital e tecnologias baseadas em sequenciamento de nova geração, podem ser padronizadas e utilizadas para detectar alterações gênicas associadas à LMA. **Conclusão:** O avanço no diagnóstico molecular pode ser promissor no tratamento ideal e personalizado.

Palavras-chave

Células Sanguíneas; Leucemia mieloide; Prognóstico; Tecnologia

INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença agressiva de malignidade hematológica caracterizada por anormal proliferação e diferenciação de células mieloides imaturas.⁽¹⁾ A LMA é uma das neoplasias mais frequentes, complexas e heterogêneas. O prognóstico depende muito das anormalidades citogenéticas, epigenéticas e moleculares adquiridas. Apesar dos avanços na compreensão da biologia da LMA, as taxas de sobrevivência permanecem bastante baixas.⁽²⁾

Na maioria dos pacientes, os fatores que podem desencadear LMA ainda são desconhecidos, mas a origem genética está fortemente associada. Fatores ambientais, incluindo exposição a produtos químicos, como benzeno, também podem estar associados à LMA. Pacientes com história de síndromes mielodisplásicas (SMD) ou neoplasias mieloproliferativas (NMP) e aqueles que receberam radiação e/ou quimioterapia anteriormente também apresentam risco de desenvolver a doença.⁽³⁾

Todas as neoplasias mieloides são consideradas doenças clonais decorrentes de células-tronco hematopoiéticas. A LMA é diagnosticada como uma doença de apresentação aguda com mais 20% da medula óssea ou blastos mieloides circulantes, e os subgrupos como doenças crônicas. As síndromes mielodisplásicas são consideradas distúrbios pré-leucêmicos, caracterizados por hematopoiese ineficaz, citopenias, frequentemente com anormalidades citogenéticas clonais detectadas, com menos 20% de blastos de medula óssea e uma propensão para progressão secundária para LMA (LMA secundária).⁽⁴⁾

Existem cerca de 20.000 novos casos de LMA diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil a incidência de LMA é desconhecida, uma vez que o INCA relata apenas dados referentes às leucemias em geral. Os dados correspondem somente ao risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres em 2020.⁽⁵⁾

¹ Mestre em Ciências de Alimentos com ênfase em Microbiologia e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia; Especialista em Análises Clínicas e Gestão Laboratorial pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

² Mestre em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, BA, Brasil.

Recebido em 27/06/2021

Aprovado em 15/07/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102161

A LMA pode afetar pessoas de todas as idades, mas é muito mais comum em adultos mais velhos, com a incidência maior para aqueles com 65 ou mais anos de idade sendo 20,1%. A idade média no diagnóstico é de 68 anos e é mais frequentemente diagnosticada entre pessoas com idade entre 65 e 74 anos. Além disso, a incidência é maior em homens em comparação com as mulheres.⁽⁶⁾

Durante os últimos anos, houve um grande progresso na compreensão da patogênese da doença e no desenvolvimento de ensaios diagnósticos e novas terapias. Apesar dos grandes avanços na identificação de marcadores clinicamente relevantes para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença, ainda existem vários fatores genéticos que precisam ser aprofundados para otimizar o diagnóstico.⁽⁷⁾

O diagnóstico e a classificação das neoplasias mieloides foram descritos na classificação revisada da Organização Mundial da Saúde (OMS) de neoplasias hematopoiéticas, publicada em 2008. De acordo com a classificação, as entidades patológicas são definidas por uma combinação de características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas.⁽⁸⁾ Revisada em 2016, as categorias de LMA mostraram avanços significativos no panorama genético e molecular. Os perfis moleculares no diagnóstico, remissão e acompanhamento podem se transformar em um padrão de atendimento, utilizando perfis mutagênicos, em vez de testes de um único gene.⁽⁷⁾

A inclusão sucessiva de novas alterações moleculares modificou substancialmente a classificação e a compreensão da LMA na última década. Contudo, as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) auxiliaram na acelerada descoberta de novas alterações moleculares. O NGS foi utilizado com sucesso em vários estudos e forneceu uma visão geral das mutações moleculares, bem como da evolução clonal da LMA. O amplo espectro de anormalidades descobertas por tecnologia de sequenciamento de nova geração está atualmente sob extensa validação de seus valores prognósticos e terapêuticos.

No entanto, esses grandes avanços moleculares no diagnóstico parecem promissores para terapia personalizada individualmente para pacientes com uma categoria de doença maligna caracterizada por extrema heterogeneidade molecular, como LMA.^(9,10) A avaliação do perfil genético no

momento do diagnóstico, como também na recidiva, é de extrema importância. Considerando o aqui exposto, o presente estudo realizou uma revisão sistemática da literatura sobre avanços no diagnóstico na leucemia mieloide aguda através das técnicas de biologia molecular.

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre os avanços no diagnóstico na leucemia mieloide aguda através das técnicas de biologia molecular. O trabalho foi realizado no período de novembro de 2020 a 2021.

A estratégia de busca para a elaboração da revisão sistemática foi através do protocolo Prisma utilizando artigos científicos do portal de buscas PubMed, NCBI, BVSMS e também SciELO. A busca foi realizada mediante a consulta aos seguintes descritores: “leucemia” (*leukemia*) e “diagnóstico” (diagnostic), junto de suas combinações.

Os artigos inicialmente foram selecionados de acordo com o título e resumo. Em seguida foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão e, por fim, foi feita a leitura completa dos artigos selecionados, conforme Figura 1. Como critério de inclusão, foram selecionados os textos completos, estudos escritos em inglês, que tivessem abordagem em diagnóstico para leucemia mieloide aguda. Os trabalhos excluídos foram aqueles que não tinham relação com a leucemia mieloide aguda ou faziam avaliação de tratamento medicamentoso. Após a leitura dos artigos selecionados, foram extraídas as informações relevantes que respondiam ao objetivo da revisão de literatura.

RESULTADOS

Foram identificados 43 artigos na busca inicial feita no PubMed e nos outros sites. Destes, foram identificados 28 artigos, dos quais foram lidos seus títulos e resumos. Na primeira leitura foram excluídos 13 trabalhos. Após leitura completa dos artigos selecionados, foram selecionados 11 artigos que se adequaram ao estudo de sequenciamento gênico e 4 foram excluídos por não focarem o tema. Os artigos incluídos nesta revisão sistemática foram publicados no período de 2010 a 2021, conforme apresentado na Figura 2.

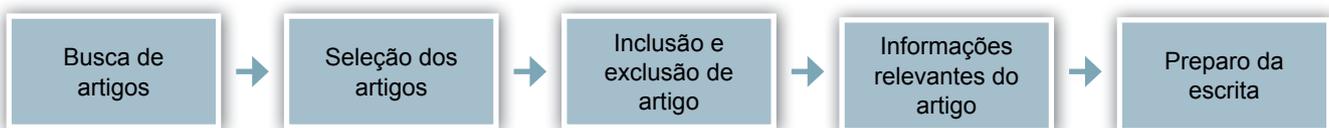


Figura 1. Fluxograma de atividades.

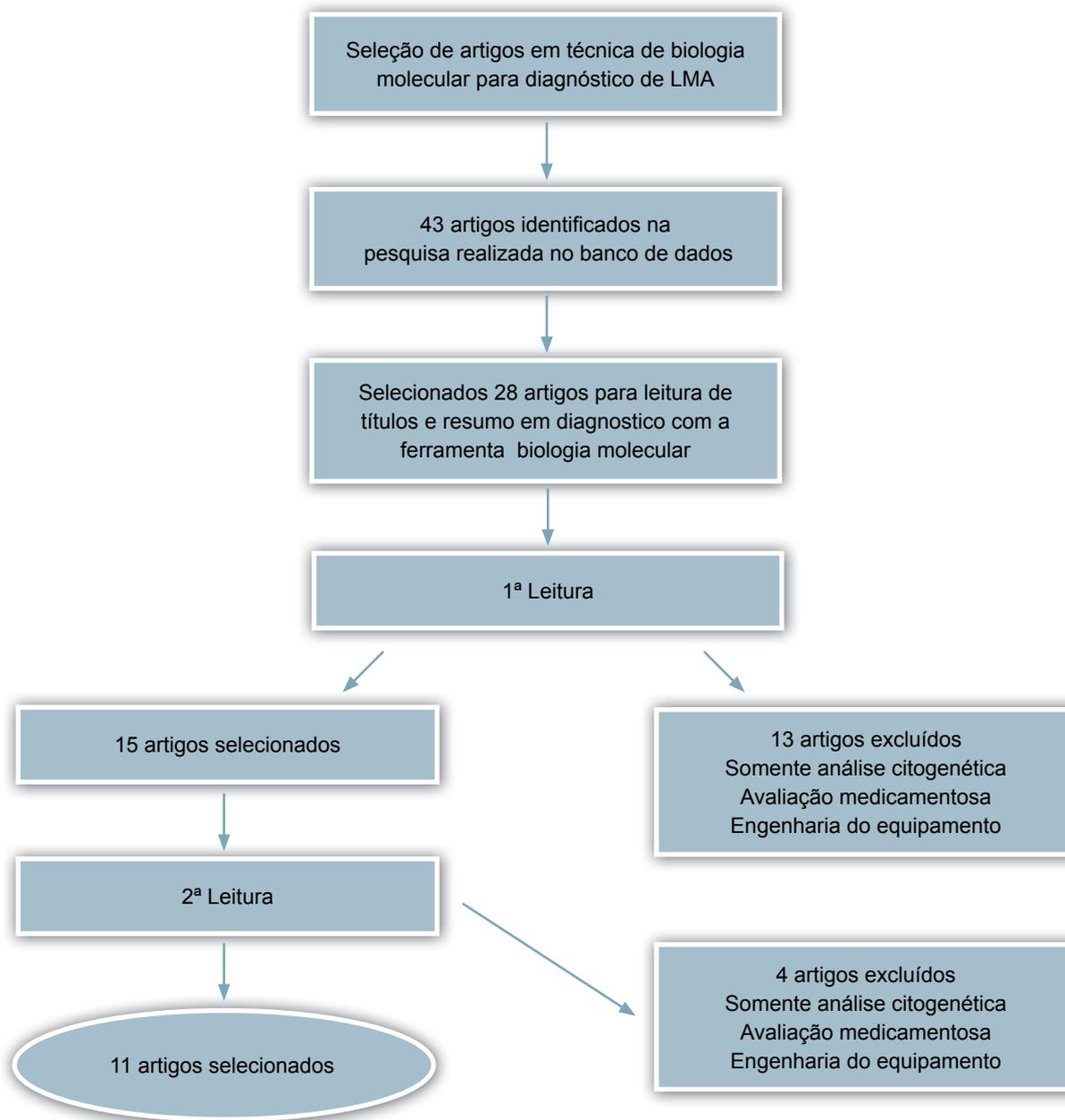


Figura 2. Fluxograma do processo de seleção dos estudos.

Os artigos incluídos no Quadro 1 nesta revisão sistemática estão relacionados ao campo do diagnóstico, prognóstico e monitoramento da leucemia mieloide aguda. Os avanços da biologia molecular como técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), como também técnicas de PCR em tempo real são utilizadas como ferramentas que integram a avaliação simultânea de vários genes-alvo em análises laboratoriais de rotina. A avaliação de neoplasias mieloides com painéis de sequenciamento de nova geração, mostra evidências de otimização no diagnóstico, auxiliando nas

decisões terapêuticas e fornecendo melhores informações sobre o prognóstico e detecção da doença residual mínima.

Os estudos de coorte realizados por Khan et al.,⁽¹¹⁾ Mack et al.,⁽¹²⁾ Schranz et al.,⁽¹³⁾ Ouyang et al.,⁽¹⁴⁾ e Onecha et al.⁽¹⁵⁾ demonstram que a tecnologia da biologia molecular aplicada e bioinformática podem fornecer uma avaliação mutagênica. O número crescente de mutações descobertas auxilia no diagnóstico e prognóstico com a detecção simultânea de múltiplas mutações somáticas em dezenas ou centenas de genes-alvo que estão associados a doenças específicas.

Quadro 1 - Principais informações dos estudos incluídos.

Referências	Tipo de estudo	Técnica	Mutações
Khan et al. ⁽¹¹⁾	Estudo de coorte	PCR	RUNX1
Morita et al. ⁽¹⁹⁾	Ensaio clínico	RT-PCR	RUNX1
Kantarjian et al. ⁽¹⁶⁾	Revisão	NGS	
Mack et al. ⁽¹²⁾	Estudo de coorte	NGS	FLT3
Liu et al. ⁽¹⁷⁾	Revisão	NGS – RNA - seq	Micro RNA
Schranz et al. ⁽¹³⁾	Estudo de coorte	PCR - NGS	FLT3
Ouyang et al. ⁽¹⁴⁾	Estudo de coorte	RT-PCR	RUNX1-RUNX1T1
Onecha et al. ⁽¹⁵⁾	Estudo de coorte	NGS - PCR	<i>NPM1, IDH1 / 2 e / ou FLT3</i>
ZHU et al. ⁽²⁰⁾	Ensaio clínico	RT-PCR	RUNX1/RUNX1T1
Yin et al. ⁽²¹⁾	Ensaio clínico	RT-PCR	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>
Puyan e Alkan ⁽¹⁸⁾	Revisão	NGS	

Nos artigos de revisão de Kantarjian et al.,⁽¹⁶⁾ Liu et al.,⁽¹⁷⁾ e Puyane Alkan⁽¹⁸⁾ foi discutida a importância da técnica de RT-PCR para detectar a fusão dos genes *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11* que são reconhecidos pela detecção sensível e permitem a quantificação da LMA residual. O monitoramento de doença residual mínima (MRD) por meio quantitativo RT-PCR, em pontos de tempos específicos da doença, permite identificação de pacientes com alto risco de recidiva. Concomitante, com o método de PCR, o sequenciamento por análise multivariada mostrou que o status positivo mínimo residual da doença é um fator independente associado ao risco de morte. Este método NGS simplifica e padroniza a avaliação da doença residual mínima, com alta aplicabilidade na leucemia mieloide aguda, além de ser clinicamente aplicável no estabelecimento de um sistema de estratificação de risco preciso, para orientar as decisões terapêuticas.

DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática evidencia que a ferramenta da biologia molecular contribui para o conhecimento das variáveis genéticas e clínicas, auxiliando na determinação do tratamento e possível prognóstico para pacientes de leucemia mieloide aguda. Aproximadamente 45% dos pacientes apresentam cariótipo normal, conforme detectado pela citogenética convencional durante o diagnóstico, mas mutação somática pode ser identificada em 97,3% dos casos. O sequenciamento genético pode identificar várias mutações que carregam informações prognósticas, incluindo mutações em *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *CEBPA* e *TET2*.^(10,12,15,16)

O diagnóstico de LMA é baseado principalmente na identificação de 20% ou mais de blastos mielóides na medula óssea e/ou sangue periférico. Além disso os mieloblastos, monoblastos e megacarioblastos são incluídos na contagem.

Antes de 2001, o limite para o diagnóstico de LMA era de 30% de blastos, que posteriormente foi reconsiderado e definido para 20%. Contudo a análise citogenética é um componente importante e obrigatório do diagnóstico de LMA, que consiste em análise das alterações genéticas, que envolve o cultivo celular e diferentes técnicas de bandamento cromossômico. Estudos demonstram que, além de ser uma ferramenta diagnóstica poderosa, os achados citogenéticos e genéticos moleculares no pré-tratamento é um dos principais marcadores prognósticos independentes do tipo LMA e determinam a resposta e o resultado do tratamento quimioterápico.^(1,22-24)

O Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) se baseia nas análises citomorfológica e citoquímica, para classificar a LMA em oito subgrupos. Esta classificação de LMA foi revisada e atualizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Associação Europeia de Hematopatologia e Sociedade de Hematopatologia, classificando a LMA levando em consideração as anormalidades citogenéticas ou genéticas moleculares.⁽¹⁾

As alterações cromossômicas são encontradas no diagnóstico em aproximadamente 50% - 60% dos pacientes adultos com LMA. As mais comuns são t(8; 21), inv(16) ou t(16; 16), t(15; 17), trissomia do cromossomo 8 e rearranjos de 11q,⁽²⁴⁾ assim como alterações do cromossomo 5 e/ou cromossomo 7, que são bastante frequentes na doença. No entanto, pesquisas em células leucêmicas de pacientes com LMA têm identificado mutações gênicas adquiridas somaticamente com expressão desregulada de genes bem como os de microRNAs. Esses estudos demonstram avanço no diagnóstico e a heterogeneidade no conhecimento da patobiologia da LMA.⁽²⁵⁾

O papel dos microRNAs vem se destacando. São caracterizados por serem moléculas pequenas de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos que se ligam ao 3'-não

traduzido a região (3'-UTR) do mRNA alvo que regula negativamente a expressão do gene alvo no nível transcricional.^(26,27) Os miRNAs participam principalmente na patogênese da LMA através dos cinco seguintes mecanismos: alteração do número de cópias, mudança na proximidade com a região genômica oncogênica devido à translocação cromossômica, alterações epigenéticas, alterações direcionadas para regiões promotoras de miRNA por fatores de transcrição alterados ou oncoproteínas e, finalmente, processamento alterado de miRNAs.⁽⁹⁾

Cada subtipo de LMA parece exibir um miRNA único que o distingue dos outros. Os miRNAs são considerados biomarcadores com ampla presença em variados tecidos. Sua sequência é altamente conservada com detecção fácil, estável e sensível.⁽²⁹⁾ Pesquisas demonstram que assim como a descoberta de miRNAs, os RNAs não codificantes (ncRNAs) e RNAs circulares (circRNAs) abrem novas perspectivas para o diagnóstico e prognóstico, como também para o tratamento. Os ncRNAs são pequenas moléculas funcionais de RNA que não são traduzidas em uma proteína.^(30,31) Essas moléculas regulam a transcrição e tradução do DNA e podem ser descobertas com uso da tecnologia de RNASeq. Os ncRNAs estão intimamente relacionados à leucemogênese da LMA, e sua descoberta mostra o importante papel na proliferação de células leucêmicas, diferenciação e apoptose; alguns podem ser utilizados como potentes biomarcadores de prognósticos.^(28,29)

Estudos recentes destacaram o potencial de novas tecnologias de sequenciamento para descobrir genes de fusão associados à LMA. Se a análise citogenética falhar, a hibridização fluorescente *in situ* é uma opção para detectar rearranjos de genes como *RUNX1-RUNX1T1*. A investigação diagnóstica deve incluir a triagem de mutações em *NPM1*, *CEBPA* e *RUNX1*, genes que podem definir categorias da doença, otimizando o diagnóstico. A hibridização fluorescente *in situ* é um método que pode ser utilizado para auxiliar a citogenética, pois detecta alterações cromossômicas, rearranjos de genes e avalia as células tanto na interfase quanto na metáfase, sendo um método mais sensível, uma vez que a citogenética só avalia na fase metáfase.^(19,32)

O desenvolvimento de técnicas de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) para detectar os genes de fusão *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11* possibilitou a detecção sensível e quantificação de genes da LMA. Embora apenas alguns dos marcadores moleculares recentes tenham sido identificados na prática clínica atual, pela técnica de RT-PCR a lista de genes provavelmente será expandida nos testes de genes únicos para serem substituídos por painel de genes ou plataformas simultâneas de mutações genéticas e arranjos genéticos. Portanto, a técnica de PCR permite identificar genes que estão relacionados com as translocações. Em cerca de 60% dos adultos jovens, as células de leucemia são informativas para um marcador

molecular que pode ser rastreado por ensaios RT-qPCR baseados em RNA. A sensibilidade do ensaio depende da expressão relativa do alvo em blastos leucêmicos em comparação com genes de manutenção padrão.^(20,32)

Estudos de Ouyang et al. (2016)⁽¹⁴⁾ foram realizados utilizando a técnica RT-PCR quantitativo e citometria de fluxo multiparâmetros (CMF) com o objetivo de avaliar a doença residual mínima (MRD), que permite a identificação daqueles pacientes com alto risco de recidiva. As análises foram realizadas em 42 pacientes e o monitoramento da doença residual mínima por RT-qPCR em pontos de tempos específicos permitem a identificação de pacientes com alto risco de recidiva. Apesar disso, a maioria desses estudos mostrou que um alto nível de RT-qPCR no final do tratamento ou um aumento do nível de RT-qPCR durante o acompanhamento predispõem à recidiva. No entanto, a imunofenotipagem e a citometria de fluxo multiparâmetros (CMF) são considerados como exames de alta relevância no diagnóstico para várias desordens hematopoiéticas linfoproliferativas crônicas, como linfomas não Hodgkin, leucemias agudas, crises blásticas, desordens mieloproliferativas crônicas, sendo aplicável em mais de 90% de todos os pacientes com LMA, também auxiliando no diagnóstico da recidiva da doença.⁽³³⁾

Estudos realizados por Schranz (2018)⁽¹³⁾ analisam as mutações frequentes do gene *FLT3* que estão associadas a prognóstico desfavorável da LMA. No diagnóstico, o *FLT3-ITD* é rotineiramente avaliado por análise de fragmentos e fornece informações do sequenciamento de amplicon de alto rendimento (HTAS) baseado no cDNA de 250 pacientes com LMA positivo para *FLT3-ITD*. O status do *FLT3-ITD* é determinado por diagnósticos de rotina, e durante este estudo foi confirmado por HTAS que 242 dos 250 pacientes (97%) teriam a mutação. O método de HTAS detectou um número grande de genes mutacionais indicando maior sensibilidade. Sendo a utilização da técnica de sequenciamento viável para a detecção de *FLT3-ITD* em pacientes com LMA analisando tanto a sequência como a carga mutacional desta alteração em um único ensaio com alta sensibilidade.

CONCLUSÃO

O progresso nas descobertas da patogênese molecular da LMA e a identificação de determinantes genéticos, tanto para diagnóstico como para prognóstico, e da resposta ao tratamento têm sido relevantes, e a tradução desses achados para a tomada de decisão clínica tem aumentado nos últimos anos. A disponibilidade do perfil molecular permite um tratamento direcionado.

As novas tecnologias de sequenciamento para descobrir genes de fusão associados à LMA vêm crescendo. A investigação diagnóstica na triagem de mutações gênicas que auxiliam na detecção de anormalidades genéticas

contribui de forma preponderante no prognóstico. A triagem mutacional para os genes *NPM1*, *FLT3* e *CEBPA* tem mostrado que esses marcadores podem ser utilizados para avaliar a doença residual mínima (MRD), bem como no desenvolvimento de novos agentes antileucêmicos.

As técnicas moleculares, incluindo PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), PCR digital e tecnologias baseadas em sequenciamento de nova geração (NGS), podem ser padronizadas e utilizadas para detectar alterações genéticas associadas à LMA, sendo crucial para a decisão de tratamento ideal e nos direcionando para um tratamento personalizado.

Abstract

Introduction: Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous malignant clonal disorder of the hematopoietic system, characterized by the uncontrolled proliferation of abnormal and immature blast cells and impaired production of normal blood cells. Objective: to present the advances in diagnosis in Acute Myeloid Leukemia through the techniques of molecular biology. Methodology: The research was carried out in the electronic databases for scientific articles of the search portal PubMed, NCBI, BVSMS, also SciELO. Results: Molecular techniques, including real-time quantitative PCR (RT-qPCR), digital PCR and technologies based on new generation sequencing, can be standardized and used to detect AML-associated gene changes. Conclusion: The advance in molecular diagnosis can be promising in the ideal and personalized treatment.

Keywords

Blood Cells; Myeloid Leukemia; Prognosis; Technology

REFERÊNCIAS

- Tamamyian G, Kadia T, Ravandi F, Borthakur G, Cortes J, Jabbour E, et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 feb; 110: 20-34, doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.12.004.
- Skayneh H, Jishi B, Hleihel R, Hamieh M, Darwiche N, Bazarbachi A, et al. A critical review of animal models used in acute myeloid leukemia pathophysiology. *Genes (Basel)*. 2019 aug; 10(8): 614. doi: 10.3390/genes10080614.
- Hou H-A, Lin C-C, Chou W-C, Liu C-Y, Chen C-Y, Tang J-L, et al. Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014; 28(1): 50-58. doi: 10.1038/leu.2013.236.
- Heo SK, Noh EK, Jeong YK, Ju LJ, Sung JY, Yu HM, et al. Radotinib inhibits mitosis entry in acute myeloid leukemia cells via suppression of aurora kinase a expression. *Tumour Biol*. 2019 may; 41(5). doi: 10.1177/1010428319848612.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- Carter JL, Hege K, Yang J, Kalpage HA, Su Y, Edwards H, et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; 5(288).
- Kansal R. Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. *Cancer Biol Med*. 2016 mar; 13(1): 41-54. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0001.
- Kulsoom B, Shamsi TS, Ahmed N, Hasnain SN. Recent advances in diagnostic and prognostic aspects of acute myeloid leukaemia. *J Pak Med Assoc*. 2017 oct; 67(10): 1580-1587.
- Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MA, Cortes-Penagos C. Acute myeloid leukemia-genetic alterations and their clinical prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2017 oct;11(4): 328-339.
- Kayser S, Levis MJ. Clinical implications of molecular markers in acute myeloid leucemia. *Eur J Haematol*. 2019 jan; 102(1): 20-35. doi: 10.1111/ejh.13172.
- Khan M, Cortes J, Kadia T, Naqvi K, Brandt M, Pierce S, et al. Clinical Outcomes and Co-Occurring Mutations in Patients with RUNX1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug; 18(8): 1618. doi: 10.3390/ijms18081618.
- Mack EKM, Marquardt A, Langer D, Ross P, Ullsch A, Kiehl MG, et al. Comprehensive genetic diagnosis of acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):277-287. doi:10.3324/haematol.2018.194258.
- Schranz K, Hubmann M, Harin E, Vosberg S, Herold T, Metzler KH, et al. Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leucemia. *Oncotarget*. 2018 Jul 10; 9(53):30128-30145. doi: 10.18632/oncotarget.25729.
- Ouyang J, Goswami M, Peng J, Zuo Z, Daver N, Borthakur G, et al. Comparison of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis and Quantitative RT-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*. June 2016; 145: 769-777. doi: 10.1093/AJCP/AQW038.
- Onecha E, Linares M, Rapado I, Ruiz-Heredia Y, Martinez-Sanchez P, Cedená T, et al. A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leucemia. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):288-296. doi: 10.3324/haematol.2018.194712.
- Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021 Feb 22;11(2):41. doi: 10.1038/s41408-021-00425-3.
- Liu Y, Cheng Z, Pang Y, Cui L, Qian T, Quan L, et al. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leucemia. *J Hematol Oncol*. 2019 may; 12(1): 51. doi: 10.1186/s13045-019-0734-5.
- Puyan FO, Alkan S. The Progress of Next Generation Sequencing in the Assessment of Myeloid Malignancies. *Balkan Med J*. 2019 Feb 28; 36(2): 78-87. doi: 10.4274/balkanmedj.galenos.2018.2018.1195.
- Morita K, Noura M, Tokushige C, Maeda S, Kiyose H, Kashiwazaki G, et al. Autonomous feedback loop of RUNX1-p53-CBFB in acute myeloid leukemia cells. *Scientific Reports*. 2017 nov; 7(16604). doi: 10.1038/s41598-017-16799-z.
- Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, Liu DH, Jiang H, Chen H. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013; 121(20): 4056-4062. Doi:10.1182/blood-2012-11-468348.
- Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012; 120(14): 2826-2835. doi:10.1182/blood-2012-06-435669
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the european LeukemiaNet. *Blood*. 2010 jan; 115(3): 453-74. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- Parikh SA, Jabbour E, Koller CA. Adult acute myeloid leukemia. In: Kantarjian HM, Wolff RA, Koller CA. *The MD Anderson Manual of Medical Oncology*. 2nd. New York, NY: McGraw-Hill; 2011.

24. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*. 2011 feb; 117(7): 2137-45. doi: 10.1182/blood-2010-08-301713.
25. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 jul; 114(5): 937-51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
26. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007 dec; 318(5858): 1931-4. doi: 10.1126/science.1149460.
27. Wallace JA, O'Connell RM. MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. *Blood*. 2017 sep; 130(11): 1290-1301. doi: 10.1182/blood-2016-10-697698.
28. Liu Y, Cheng Z, Pang Y, Cui L, Qian T, Quan L, et al. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leucemia. *J Hematol Oncol*. 2019 may; 12(1): 51. doi: 10.1186/s13045-019-0734-5.
29. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*. 2013 jul; 4(119). doi: 10.3389/fgene.2013.00119.
30. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA. *Science*. 2002 sep; 297(5589): 2053-6. doi: 10.1126/science.1076311.
31. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 sep; 373(12): 136-52. doi: 10.1056/NEJMra1406184.
32. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129(4): 424-447. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196.
33. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? *J Clin Oncol*. 2016 feb; 34(4): 329-36. doi: 10.1200/JCO.2015.63.3826.

Correspondência

Flávia Martins da Silva

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Programa de Pós-Graduação em

Análises Clínicas e Gestão Laboratorial

Rua Dom João VI, Brotas

Salvador-BA CEP 40290-000

E-mail: fafanutribio@gmail.com

Importância do diagnóstico precoce da *Chlamydia trachomatis* Importance of early diagnosis of *Chlamydia trachomatis*

Maria Lucia Uttagawa¹
Ivanna Maria Costa de Araujo²

Resumo

A OMS estima que mais de 1 milhão de infecções sexualmente transmissíveis é adquirido todos os dias em todo o mundo. Dentre as ISTs, a clamídia é a principal causa da doença inflamatória pélvica e de infertilidade em mulheres em todo o mundo. Para esta pesquisa foi realizada uma revisão sistemática. O processo de revisão foi realizado através de uma busca na base de dados eletrônica, como PubMed, Scielo, Google Acadêmico, e em livros didáticos, utilizando os descritores infertilidade, IST, *Chlamydia trachomatis*. O objetivo deste estudo é buscar na literatura estudos que relatam a relação da *Chlamydia trachomatis* (CT) com problemas de infertilidade e os melhores métodos de diagnósticos e custo/benefício. O estudo concluiu que a CT é uma IST bastante prevalente no mundo e preocupante devido às complicações que muitas vezes são irreversíveis, como a infertilidade. Dentre os testes existentes no mercado, a PCR e a captura híbrida foram os que apresentaram melhor sensibilidade e especificidade.

Palavra-chave

Infertilidade; *Chlamydia trachomatis*; doença inflamatória pélvica; DST

INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* (CT) é um bacilo Gram-negativo, intracelular, obrigatório que tem tropismo por células epiteliais colunares, conjuntiva, uretra, endocérvix, endométrio, trompa etc. O risco a esta infecção do trato genital feminino está relacionado a vários fatores, como: início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros sexuais, não uso do preservativo nas relações sexuais, uso de contraceptivos hormonais orais por mulheres jovens, nuliparidade, presença de ectopia cervical, hábito de fumar, falta de conhecimento sobre as DST.⁽¹⁾

Mais de 1 milhão de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) é adquirido todos os dias em todo o mundo. Dentre as ISTs, a clamídia é uma das principais causas da doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade em mulheres. A CT atinge pessoas de ambos os sexos e independe da idade, atingindo preferencialmente a fase reprodutiva das mulheres.⁽²⁾

A infecção geralmente se manifesta de forma silenciosa e, como consequência desta manifestação, pode acarretar a DIP, gestação ectópica, endometrite pós-parto, parto prematuro, conjuntivites e manifestações respiratórias no recém-nascido. Estudos mostram que 70% a 80% das infecções em mulheres são assintomáticas e atuam como reservatórios.⁽³⁾

Outra manifestação importante é a infertilidade. Define-se infertilidade como a ausência de gravidez após 12 meses de relações sexuais sem nenhum método de contracepção. Segundo estudos, alguns fatores estão relacionados com a infecção por CT, obesidade, síndrome dos ovários policísticos, doença celíaca. A infertilidade afeta de 10% a 15% dos casais nos Estados Unidos e aproximadamente 20% de todas as pessoas no mundo.⁽⁴⁻⁶⁾

Estudos têm relatado que a detecção precoce de anti-Chsp60 pode ser usada como marcador diagnóstico e fator preditivo útil para *C. trachomatis* induzida à fertilidade. Mulheres com infertilidade tubária secundária associada a *C.*

¹ Docente da Universidade Anhembi Morumbi.

² Graduanda em Biomedicina da Universidade Anhembi Morumbi.

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi. São Paulo, SP, Brasil.

Recebido em 11/08/2020

Aprovado em 05/01/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102056

trachomatis foram mais propensas a ter anti-Chsp60. Dados sugerem que a detecção de anticorpos Chsp60 ajudaria no prognóstico precoce de sequelas imunopatológicas em mulheres infectadas por *C. trachomatis* e no controle em um estágio inicial.^(7,8)

As proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*) são proteínas de estresse existentes em diversos organismos e estão envolvidas com a sobrevivência desses organismos em condições ambientais adversas. Durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos as proteínas de choque térmico exibem vias de expressão específica. As HSPs e chaperonas desenvolvem funções importantes para a regulação da diferenciação, divisão e apoptose celular. Assim, acredita-se que a presença de HSPs seja essencial para a multiplicação celular.⁽⁹⁾

A salpingite é considerada a principal causa de infertilidade tubária e de gravidez ectópica principalmente em mulheres com infecções recorrentes ou após um longo período de contaminação por CT. A infecção pela bactéria nas tubas uterinas da mulher pode provocar o bloqueio ou a formação de cicatrizes, tornando difícil ou impossível a geração de um bebê.⁽¹⁰⁾

No Brasil, os dados existentes na literatura sobre a infecção pela CT são referentes a amostras pequenas, geralmente específicas de um serviço ou de um município, carecendo de estudos envolvendo as diferentes regiões do país.⁽¹¹⁾

Em recente revisão de medidas de prevenção para as DST, publicada pela Força Tarefa de Prevenção dos EUA (US Preventive Services Task Force), foi reforçada a importância da introdução da investigação da infecção pela CT durante o pré-natal de adolescentes e mulheres jovens.⁽¹²⁾

O objetivo deste estudo é buscar na literatura estudos que relatam a relação da *C. Trachomatis* com problemas de infertilidade e avaliar os melhores métodos de diagnósticos e custo/benefício.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho se baseia numa revisão sistemática. O processo de revisão foi realizado através de uma busca na base de dados eletrônica, como PubMed, Scielo, Google Acadêmico e em livros didáticos. Para o levantamento dos artigos foram realizadas três etapas de leitura minuciosa. Assim, a princípio o critério de inclusão foram baseados nas palavras-chave: infertilidade, IST, doença inflamatória pélvica, *Chlamydia trachomatis*, métodos diagnósticos. Com estes critérios foram obtidos artigos científicos do período de 1999 a 2012.

A primeira etapa do estudo foi realizar uma leitura rápida no título e o resumo dos artigos. Os artigos com informações de acordo com a proposta do estudo foram incluídos. Após a seleção dos artigos foi realizada a segunda leitura, dando

ênfase ao método, aos resultados e às conclusões e, por fim, na última etapa, ocorreu a leitura de uma nova seleção dos artigos de interesse.

DESENVOLVIMENTO

Prevalência e teste diagnóstico

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil, em grupos populacionais diversos e por metodologias variadas, mostram uma incidência que oscila entre 2,1% e 31,5%. Pesquisa realizada com diferentes populações, incluindo gestantes, trabalhadores de pequenas indústrias e pacientes de clínicas de infecções sexualmente transmissíveis, mostrou que do total de gestantes que realizaram os exames, 9,4% deram positivo para CT, sendo os grupos etários de maior prevalência o de 15-19 anos com 15,1% e o segundo com menores de 15 anos com 14,7% do total de infecções. As gestantes com maior número de parceiros sexuais tiveram uma probabilidade de três vezes maior de adquirir a doença que as demais.^(13,14)

Nos Estados Unidos e no Canadá, a CT é uma das ISTs de notificação, possibilitando obter dados epidemiológicos sobre o número de indivíduos que apresentam sintomas e procuraram atendimento médico. No ano de 2018, foram registrados 1.758.668 casos de infecção pela CT nos EUA, dando uma proporção de 539,9 casos para cada 100 mil habitantes. Fazendo uma comparação entre os anos de 2017 e 2018, há um aumento total de 2,9% no número de casos. Com base na análise de adultos recém-infectados por alguma DST, a OMS estimou que, entre as mulheres, a infecção ocorre mais cedo do que nos homens. Os grupos de maior prevalência por faixa etária foram em primeiro lugar os jovens de 15-19 anos e em seguida os adultos de 20-24 anos.⁽¹⁵⁾

No Canadá, em 2017, foram notificados 126.322 casos de CT no país com uma proporção de 345,7 casos para 100 mil habitantes. Do ano de 2008 para 2017 houve um aumento de 39% no número de casos notificados para esta IST. Em 2017, 60% dos infectados eram do sexo feminino, chegando a uma proporção de 412,8 casos de indivíduos do sexo feminino para 100 mil, enquanto para os indivíduos do sexo masculino esta proporção é 50% menor, chegando a 279,5 casos para cada 100 mil habitantes.⁽¹⁶⁾

Para diagnóstico da CT, existem testes diretos e indiretos. Os testes diretos de antígeno e ácidos nucleicos apresentaram maior especificidade e sensibilidade. A cultura tem sido o padrão-ouro para o diagnóstico de CT. A técnica apresenta vantagem e desvantagem; a vantagem é que ela tem maior especificidade em relação aos outros testes e como desvantagem tem o elevado custo e demora nos resultados, além de necessidade de cuidados especiais para manter o microrganismo.⁽¹⁷⁾

As técnicas de biologia molecular: a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a captura híbrida são testes bastante

sensíveis, com resultados muito semelhantes à cultura para o diagnóstico de uretrite por CT em ambos os sexos e de cervicite clamidiana nas mulheres. Estas técnicas promovem a detecção de sequências específicas de nucleotídeos da CT. As duas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes à cultura. A vantagem da captura híbrida é a possibilidade de obter resultados rápidos, e a PCR tem como desvantagem o custo alto.⁽¹⁸⁾

Dados da literatura têm demonstrado que a prevalência pode variar, dependendo da população estudada e do método utilizado para o diagnóstico. Num estudo envolvendo 3.303 gestantes de seis capitais das cinco regiões do país, utilizando a técnica de captura híbrida em amostras do canal cervical, encontrou-se taxa de prevalência de 9,4%.⁽¹¹⁾

Nos Estados Unidos, estudo realizado com gestante pelo teste de PCR obteve uma prevalência de 11,4% entre 1.974 gestantes testadas e no Equador encontrou-se uma prevalência de 8,8% de amostras endocervicais positivas, também testadas pela reação em cadeia da polimerase.⁽¹⁹⁾

A pesquisa de antígenos, através de imunofluorescência direta (DFA) possibilita a visualização direta das estruturas antigênicas da CT. Além disto, a DFA possibilita avaliar simultaneamente a adequação da amostra com uma sensibilidade em torno de 85% e uma especificidade de 98% em relação à cultura quando ambas são realizadas em condições ótimas. As desvantagens do método é a necessidade de um microscopista treinado e a dificuldade em se processar muitas amostras.⁽²⁰⁾

Os testes imunoenzimáticos, EIA (*Enzyme Immuno Assay*) e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) permitem a pesquisa de CT em grande número de amostras. Têm menor sensibilidade que a cultura celular e os métodos de biologia molecular. Um teste de ELISA conjugado com tecnologia automatizada oferece ótimos resultados.^(10,17)

Os testes indiretos podem ser com pesquisa de anticorpos séricos. São frequentemente utilizados para o rastreamento por serem fáceis para coleta e realização, mas têm restrições por apresentarem reações cruzadas e não serem adequados para pesquisa de infecção ativa. A pesquisa de anticorpos anticlamídia tem valor diagnóstico nas infecções complicadas, como linfogranuloma venéreo, tracoma, endometrite, salpingite, periepatite, síndrome de Reiter e pneumonia. Não é usada em diagnóstico de infecções superficiais, como uretrite e cervicite.^(10,17,20)

Pesquisa de anticorpos anticlamídia, realizada em Mato Grosso do Sul, obteve a prevalência de 7,3%, enquanto no Rio Grande do Sul encontrou-se 4,3% de prevalência.⁽¹⁴⁾

Também é possível se fazer o diagnóstico de CT a partir da citologia oncótica, pela coloração de Papanicolaou, desde que sejam evidenciados critérios morfológicos específicos da infecção, como a presença de células metaplásicas com citoplasma finamente vacuolizado, com aparência de *moth-eaten* (comido de traça), sendo esses

vacúolos delimitados por membranas finas, bem definidas, contendo no interior estruturas puntiformes eosinofílicas, compatíveis com corpúsculos elementares. Na coleta da amostra é de extrema importância a presença de células glandulares endocervicais e/ou metaplásicas, visto que a CT é um microrganismo intracelular obrigatório, com preferência por estas células.^(21,22)

Segundo estudos, o exame de Papanicolaou apresenta baixa sensibilidade e não deve ser usado como método de rastreio para a CT. Isto ocorre porque os vacúolos citoplasmáticos podem ser interpretados erroneamente.⁽²³⁾

Estudos com teste rápido para a CT Bioeasy® apresentaram sensibilidade de 88,5%. A baixa prevalência encontrada entre as gestantes pesquisadas neste estudo se deve, em parte, ao teste utilizado para a detecção da *C. trachomatis*, haja vista que as técnicas que utilizam a PCR apresentam sensibilidade que se aproxima de 100%.⁽²⁴⁾

Fatores de risco

Pesquisa recente, realizada pela American Social Health Association (ASHA), investigou 1.115 adultos, na faixa etária entre 18 e 35 anos, avaliando os seus conhecimentos e atitudes frente às doenças sexualmente transmissíveis, demonstrando que 45% das pessoas solteiras não fazem uso de preservativos em suas relações sexuais, 93% das pessoas acreditam que os seus parceiros sexuais atuais ou recentes não têm nenhuma DST, somente um em cada três dos pesquisados conversa com os seus parceiros a respeito de DST e menos da metade deles conversa sobre DST com os seus médicos durante a consulta.^(19,24)

Outro fator é a idade precoce do início sexual. Vários estudos mostram associação da infecção pela CT e gonorreia, com o número de parceiros sexuais, com a troca frequente de parceiros, relacionamento com parceiro sabidamente infectado e ter menos de 20 anos de idade. Também foi observado que as gestantes com maior número de parceiros sexuais têm uma probabilidade 3 vezes maior de adquirir a doença do que nas demais mulheres.^(11,14)

Complicações por *C. trachomatis*

A grande preocupação atualmente em todo o mundo são as complicações que ocorrem como a salpingite e a doença inflamatória pélvica aguda. O risco de esterilidade tubária por salpingite causada por CT é de 20% a 30%, afetando diretamente a vida reprodutiva da mulher.⁽²⁵⁾

A infecção prolongada por *C. trachomatis* pode induzir hidrossalpinge, bem como a produção de anticorpos contra proteínas de choque térmico de clamídia, que possuem 60 kDa (Chsp60). A presença de imunidade cervical contra a proteína Chsp60 foi associada com insucessos de fertilização *in vitro* (FIV), possivelmente devido à indução de autoimunidade contra as proteínas de choque térmico, homóloga humana de Chsp60.⁽⁷⁾

Spandofer et al. realizaram um estudo correlacionando infecções por CT, infertilidade tubária e a presença de anticorpos contra as Chsp60 e falhas com as técnicas de FIV. Os resultados mostraram uma forte associação aos anticorpos circulantes para os antígenos estruturais de CT, nas mulheres com oclusão tubária.^(26,27)

Uma das sequelas da DIP é o dano tubário, que tem sido objeto de vários estudos visando a identificação e o tratamento dessa condição. Pesquisa realizada na Holanda, envolvendo 295 pacientes inférteis, compara o teste de anticorpos para *C.trachomatis* (CAT) com a histerossalpingografia (HSG) para a avaliação do fator tubário, mostrando iguais valores preditivos entre os dois métodos. Com este estudo foi possível observar que o CAT causa um mínimo de desconforto à paciente em comparação com a HSG e é considerado um bom meio de triagem à indicação da laparoscopia.⁽²⁸⁾

Estudo realizado no Reino Unido com 1.006 mulheres revela que o resultado do CAT comparado com os achados laparoscópicos apresenta uma tendência linear entre dano tubário e positividade para o CAT. Entre mulheres com títulos negativos, somente 17% tinham algum dano tubário e 6% tinham lesões tubárias severas, comparados com 100% e 73% nas pacientes que tinham títulos elevados, respectivamente. Com base neste estudo, os autores recomendam que a pesquisa para CT deve ser um teste de *screening* para verificar a chance de patologia tubária em mulheres que buscam tratamento para esterilidade, facilitando a tomada de decisões para o prosseguimento da propeidética.⁽²⁹⁾

Outro estudo realizado na Holanda por Hartog, 2004, detectou a presença de lesões tubárias mínimas ou endometrite silenciosa, comprometendo a fertilidade, associada à presença de anticorpos para *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia psittaci*, sugerindo que os microrganismos viáveis no trato genital superior podem ocasionar infertilidade, embora seus achados laparoscópicos se mostrem normais.⁽³⁰⁾

Outra grande consequência de infecção por CT são os problemas encontrados durante a gestação: trabalho de parto prematuro, amniorrexe prematura, baixo peso ao nascer, óbito neonatal e endometrite pós-parto.⁽³¹⁾

DISCUSSÃO

No Brasil são raros os serviços de saúde que oferecem sistematicamente a pesquisa deste microrganismo como parte de uma consulta ginecológica ou de pré-natal. Nos serviços privados de saúde, só se pesquisa CT em casos sintomáticos, quando um dos parceiros sexuais relata a presença da bactéria ou para investigação de infertilidade. Mesmo nesta situação, a pesquisa laboratorial não faz parte da rotina da maioria dos serviços de saúde.^(11,28)

Nos países desenvolvidos, o rastreamento da CT tem se mostrado uma estratégia importante para redução das

complicações associadas ao quadro infeccioso. No Brasil, milhões de reais são gastos anualmente com antibióticos, internações, cirurgias e tratamentos de infertilidade decorrentes de infecção por CT.^(11,18)

Vários trabalhos confirmam a baixa sensibilidade do diagnóstico clínico da infecção por CT, pois cerca de 70% das mulheres infectadas são assintomáticas.⁽¹¹⁾

Essas infecções, quando não tratadas, tendem a tomar o trajeto ascendente, acometendo o trato reprodutivo superior, podendo levar a sequelas tais como: dor crônica, gravidez ectópica, infertilidade de causa tubária, abortos em 12% a 20% das mulheres acometidas, natimortos e prematuridade, além de infecções congênitas, perinatais e puerperais.^(11,25)

As taxas de transmissão vertical em mulheres infectadas por CT não tratadas se aproximam de 70%, causando conjuntivite em 20% a 50% e pneumonia em 10% a 20% dos recém-nascidos expostos, e as infecções por gonorreia respondem por cerca da metade dos casos de conjuntivite neonatal nos países em desenvolvimento.^(32,33)

CONCLUSÃO

Estratégias de rastreamento envolvendo a introdução de técnicas laboratoriais mais sofisticadas e sensíveis são sempre motivo de intenso debate por apresentarem maior custo imediato ao sistema de saúde. Há que se observar, no entanto, que o investimento em diagnóstico precoce e em tratamento adequado das infecções por CT representará uma redução do impacto financeiro de despesas com agravos à saúde da população, particularmente em mulheres e crianças.

Diante do estudo, seria interessante incentivar a inclusão e uso sistemático de testes de biologia molecular, como o teste PCR e captura híbrida, e testes imunoenzimáticos para o diagnóstico deste patógeno para a população com vida sexual ativa, em serviços de pré-natal e nas clínicas de reprodução assistida.^(11,34)

Apesar do rastreamento para CT ser recomendado entre mulheres adultas jovens, pouca informação está disponível sobre a prevalência destas infecções na população adulta jovem em geral. Este fato torna-se relevante principalmente pelo caráter assintomático que estas infecções assumem e, assim, pela dificuldade de seu rastreamento. Também foi observado que não há uma regularidade na solicitação do exame, por não apresentar sintomatologia.⁽²³⁾

Nenhuma outra DST tem mostrado frequência tão elevada quanto a infecção por CT. A grande dificuldade em se firmar o seu diagnóstico deve-se à falta de sintomatologia em até 80% dos indivíduos infectados.

Em ambulatórios de esterilidade é frequente a detecção de mulheres portadoras de danos tubários, por vezes irreversíveis, determinando esterilidade permanente. Estas

complicações poderiam ser evitadas se essas infecções tivessem sido detectadas e tratadas. A experiência em outros países tem mostrado que programas de detecção em massa determinam acentuada queda na incidência de DIP e, conseqüentemente, enorme economia de recursos para a saúde pública.

Abstract

The WHO estimates that more than 1 million sexually transmitted infections are acquired every day worldwide. Among STIs, chlamydia is the main cause of pelvic inflammatory disease and infertility in women worldwide. For this research a systematic review was carried out. The review process was carried out through a search in the electronic database, such as Pubmed, Scielo, Google Scholar and in textbooks, using the descriptors infertility, IST, *Chlamydia trachomatis*. The aim of this study is to search the literature for studies that report the relationship between CT and infertility problems and the best diagnostic methods and cost benefit. The study concludes that CT is an STI that is quite prevalent in the world and worrisome due to complications that are often irreversible such as infertility. Among the tests on the market, PCR and hybrid capture showed the best sensitivity and specificity.

Keywords

Infertility; *Chlamydia trachomatis*; pelvic inflammatory disease; STD

REFERÊNCIAS

- Tavares T, et al. Cervicites e seus agentes na rotina dos exames colpocitológicos. DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. 2007; v.19, n.1, p.30-34.
- World Health Organization. Sexually transmitted infections. Fact sheet nº 110 [Internet]. 2011 [citado em 2014 nov 20]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html>
- Passagnolo RC, Piazzetta S, Carvalho NS, Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. Prevalência da infecção por *Chlamydia Trachomatis* e *Neisseria Gonorrhoea* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011; 33(11):328-33.
- Sbaragli C, Morgante G, Goracci A, Hofkens T, De Leo V, Castrogiovanni P. Infertility and psychiatric morbidity. Fertil Steril. 2008; 90:2007-11.
- Santana LF, Ferriani RA, Sá MFS, Reis RM. Tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008; 30(4):201-9.
- Martins CLS, Gandolfi L, Tauil PL, Picanço MAR, Araujo MOG, Pratesi R. Doença celíaca e infertilidade feminina: associação frequentemente negligenciada. Rev Bras Ginecol Obstet. 2006; 28(10): 601-6.
- Srivastava P, Jha R, Bas S, Salhan S, Mittal A. In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected site release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat shock protein stimulation than fertile women. Reprod Biol Endocrinol. 2008; 6:20.
- Dutta R, Jha R, Salhan S, Mittal A. *Chlamydia trachomatis*-specific heat shock proteins 60 antibodies can serve as prognostic marker in secondary infertile women. Infection. 2008; 36(4):374-8.
- Ness RB, Soper DE, Richter HE, Randall H, Peipert JF, Nelson DB, et al. *Chlamydia* antibodies, *chlamydia* heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. Sex Transm Dis. 2008; 35(2):129-35.
- Valladão AS, Costa CMSP, Camargo JA, Soares VCG. *Chlamydia trachomatis* e suas implicações na reprodução humana. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70(4):457-62.
- Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008; 30(12):614-9.
- Nelson HD, Helfand M. Screening for chlamydial infection. Am J Prev Med. 2001; 20(3 Suppl):95-107.
- Benzaken AS, Sales DN, Palheta Junior JIL, Pedrosa VL, Garcia EG. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. DST J Bras Doenças Sex Transm. 2010; 22(3):129-34.
- BRASIL. Ministério da saúde. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília, DF, 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2018. Georgia, 2019.
- PHAC—Public Health Agency of Canada. Report on Sexually Transmitted Infections in Canada, 2017. Ottawa, 2019.
- Melles HHB, Colombo S, Linhares IM, Siqueira LFG. Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela *Chlamydia trachomatis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, jul-ago, 2000; 33:355-61.
- Meyer T. [Modern diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections]. Hautarzt. 2007; 58(1):24-30. German.
- World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: WHO; 2001. [Internet] [cited 2008 May 28]. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf.
- Seadi CF, Oravec R, von Poser B, Cantarelli VV, Rossetti ML. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2002; 38(2):125-33.
- GUPTA P. et al. Cytopathologic detection of *Chlamydia trachomatis* in vagino pancervical (Fast) smears. Diagnostic Cytopathol. 1988, v. 4, n.3, p. 223-29.
- Medeiros A. et al. *Chlamydia trachomatis*: Diagnóstico Citológico e por Imunofluorescência direta em uma amostra de mulheres do grande Recife. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2007, v.39, n.1, p.43-46.
- Consolaro MEL, Maria-Engler SS – Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas, in microbiologia cérvico-vaginal: Consolaro, MEL e Siqueira VLD – São Paulo: Roca, 2016.
- ASHA – People feel invincible against STDs. American Social Health Association survey Issue 08:03 may 2004.
- Rodrigues EBB, Sá RAM, Rodrigues SSO, Passos MRL, Barreto NA, Pinheiro VMS. Análise da pesquisa de *Chlamydia trachomatis* no setor de ginecologia do Instituto Fernandes Figueira. DST–J. Bras. Doenças Sex. transm. 2000;12(supl):16-22.
- Spandorfer SD, Neuer A, LaVerda D, Byrne G, Liu HC, Rosenwaks Z, et al. Previously undetected *Chlamydia trachomatis* infection, immunity to heat shock proteins and tubal occlusion in women undergoing in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1999; 14(1):60-4.
- Mendonça CR, Cirqueira MB, Amaral WN. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e anticorpos contra proteína de choque térmico 60 (HPS60) associados a fator de infertilidade tubária. FEMINA–Janeiro/Fevereiro 2012; 40(1):51-6.
- Veenemans L. *Chlamydia* test for infertility screening. Human Reproduction. 2002; 17: 695-8.
- Akanda V. *Chlamydia* serology screens for tubal damage. Human Reproduction. 2003; 18: 1841-7.
- Hartog J. *Chlamydia pneumoniae* role in tubal pathology studied. Human Reproduction. 2004; 19:1380-4.
- Wong T, Singh A, Mann J, Hansen J, McMahon S. Gender differences in bacterial STIs in Canada. BMC. Women's Health 2004; 4 (Suppl I): 526.

32. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J Infect Dis.* 2010;201 Suppl 2:S134-55.
33. Carvalho NS, Pegoraro MG, Takimura M, Oliveira Junior FC. Prevalência da infecção por Chlamydia trachomatis em parturientes jovens atendidas em uma maternidade pública. *DST J Bras Doenças Sex Transm.* 2010; 22(3):141-4.
34. Pantoja M, Campos EA, Pitta DR, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes MAS. Prevalência de infecção por Chlamydia trachomatis em mulheres candidatas à fertilização in vitro em serviço público de referência do Estado de São Paulo, *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012; 34(9):425-31.

Correspondência

Maria Lucia Utagawa

R. Dr. Almeida Lima, 1134 Mooca-SP

CEP 03164-000

E-mail: mutagawa@hotmail.com

Análise qualitativa do teste de fragilidade osmótica para amostras processadas a fresco ou após 24 horas de incubação a 37°C

Qualitative analysis of the osmotic fragility test for samples processed fresh or after 24 hours of incubation at 37°C

Alene de Oliveira Quadros¹

Lacy Cardoso de Brito Junior²

Resumo

Objetivo: Analisar qualitativamente o teste de fragilidade osmótica (F.O.) para amostras a fresco ou após incubação a 37°C. **Métodos:** Foram processadas 20 amostras de sangue periférico, coletadas em duplicata com 5mL em cada tubo com heparina, de pacientes com solicitação de F.O. como exame de rotina para processamento a fresco e após incubação por 24 horas em banho-maria a 37°C, em 13 tubos com concentrações variáveis de 0,1% a 0,9% de NaCl. **Resultados:** Foram analisadas 20 amostras de pacientes em sua maioria do gênero feminino 17/20 (85%), com idades entre 3 meses a 75 anos, para realização do teste de F.O. A análise qualitativa dos resultados mostrou que 9/20 (45%) amostras tiveram resultado concordante entre os testes de F.O. para amostras a fresco e após incubação a 37°C. Dos resultados discordantes, 8/11 (72,7%) resultados mostram fragilidade dos eritrócitos à hemólise nas amostras a fresco e curva normal (sem hemólise) após incubação da amostra a 37°C. Outros 3/11 (22,3%) resultados apresentaram curva normal (sem hemólise) no teste com amostra à fresco e resistência à hemólise no teste com a amostra após incubação a 37°C. Com o teste de Extato de Fisher não mostrou diferença estatística ($p=0,5743$) para as amostras processadas a fresco ou após incubação a 37°C. **Conclusão:** O teste de F.O. se mostrou mais eficiente quando a amostra testada foi analisada após incubação por 24 horas a 37°C em banho-maria, contudo não houve diferença estatística para resultados processados a fresco ou após incubação a 37°C.

Palavras-chave

Anemia Hemolítica; Fragilidade Osmótica; Hemólise

INTRODUÇÃO

O Teste de Fragilidade Osmótica (F.O.) ou Curva de Fragilidade Osmótica ainda hoje é um método de triagem laboratorial muito utilizado para avaliar a resistência ou fragilidade (lise) dos eritrócitos quando submetidos a variações de concentrações osmóticas em cloreto de sódio.⁽¹⁻⁹⁾ Principalmente quando outros métodos mais modernos, como o de citometria de fluxo,⁽¹⁰⁻¹³⁾ não estão disponíveis de forma ampla em todo o território nacional. Assim, a utilização do teste de F.O., ainda hoje, baseia-se no fato de se tratar de um método simples e de baixo custo, porém que também apresenta pouca precisão em função das muitas variáveis em sua execução, que vão desde erros operacionais na

diluição das soluções de cloreto de sódio até a transferência de amostras trocadas no momento da leitura em espectrofotômetro. Além do tempo de execução da técnica, que é exclusivamente manual e exige operador dedicado.⁽¹⁻⁴⁾

Esses são alguns dos fatores determinantes para que muitos laboratórios de rotina brasileiros tenham deixado de oferecer esse teste em seu rol de exames^(9,14-16). Assim, uma parcela importante de pacientes deixou de ser assistida de triagem e diagnóstico^(7-9,14,15) para anemias de caráter genético (esferocitose hereditária, epilocitose hereditária, estomatocitose hereditária e piropoiquilocitose hereditária)^(14,15,17-21) que são associadas a deficiências, qualitativas ou quantitativas, de proteínas de ligação membrana celular e citoesqueleto (complexo juncional), como por exemplo nas anemias por

¹ Biomédica, Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Universidade Federal do Pará (UFPA).

² Biomédico, Doutor, Professor Associado III do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil.

Recebido em 11/04/2020

Aprovado em 25/06/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202101979

deficiência das proteínas: banda 3, espectrina alfa, espectrina beta, anquirinas, banda 4.1, banda 4.2, demantina, actina, aducina, banda 6 e banda 7.^(14,15,17-19,22) Deficiências essas que interferem na integridade, flexibilidade, permeabilidade e/ou deformidade dos eritrócitos quando submetidos a concentrações osmolares diferentes.^(14,23)

Nessas condições de deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoequeleto o teste de F.O. pode se apresentar aumentado em anemias, como na esferocítica hereditária,^(17-19,21,22) anemia hemolítica não-esferocítica hereditária^(2,12,15,19,20,22) e nas hemolíticas adquiridas após envenenamento,^(4,6-9,23) por exemplo. Por outro lado, o mesmo teste pode apresentar-se diminuído, por exemplo, nas anemias ferropriva, talassemias,^(16,24) doença falciforme e doença da hemoglobina C. Contudo, durante a investigação dessas anemias o teste de F.O. é apenas mais um indicador para a conclusão diagnóstica, sendo necessários outros parâmetros laboratoriais para auxiliar nessa interpretação, como: o hemograma completo onde se observam alterações na concentração de hemoglobina, no hematócrito, no volume corpuscular médio (VCM), na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), na amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) e ainda na análise morfológica do esfregaço sanguíneo, com a presença de diversas formas dos eritrócitos (poiquilocitose); e a contagem de reticulócitos que se apresenta aumentada (reticulocitose).^(11,25,26)

Nesse sentido, entre as anemias por deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoequeleto, a mais frequente é a esferocitose hereditária, que apresenta aumento da lise de eritrócitos no teste de F.O., reticulocitose, hemoglobina entre 8 e 13g/dL, VCM < 82fl, CHCM>25g/dL e esferócitos na hematoscopia.^(11,12,17-19,21,22,25,26) Assim, nosso objetivo foi analisar de forma qualitativa para qual tipo de processamento de amostras, a fresco ou após incubação a 37°C por 24 horas, o teste de fragilidade osmótica é mais eficiente para uso na rotina de laboratórios de análises clínicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras biológicas

Foram incluídos nesse estudo 20 amostras de sangue periférico de pacientes com idades entre 3 meses e 75 anos que foram referenciados a um laboratório de análises clínicas particular de Belém-Pará, no período de agosto e setembro de 2018, para a realização de teste de Fragilidade Osmótica (F.O.) após consulta com seu médico hematologista que, diante das condições clínico-laboratoriais apresentadas em consulta, deliberou pela complementação diagnóstica com a solicitação do teste de F.O. isoladamente (n=6) ou em associação com o hemograma (n=14). Sem, contudo, quaisquer informações clínicas adicionais. Cada amostra era composta por dois tubos com 5,0mL cada de sangue

periférico anticoagulados com heparina, para posterior procedimento operacional padrão (POP).

Aspectos éticos

Como o estudo foi realizado apenas com amostras da rotina de Teste de Fragilidade Osmótica de pacientes que procuraram espontaneamente o laboratório, sem o contato direto ou aplicação de qualquer questionário aos sujeitos da pesquisa, os autores da pesquisa assinaram um termo de responsabilidade de guarda e sigilo dos dados junto à direção do referido laboratório, conforme prevê a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde do Brasil.

Teste de fragilidade osmótica

Para o teste de fragilidade osmótica, as soluções de uso de cloreto de sódio (NaCl) foram confeccionadas a partir de uma solução estoque de NaCl, concentrada a 10% e tamponada em tampão fostato à pH 7,4, da qual foram feitas diluições, em água deionizada, para a confecção dos 13 frascos de 100mL de soluções de NaCl nas concentrações de 0,90%; 0,80%; 0,75%; 0,65%; 0,60%; 0,55%; 0,50%; 0,45%; 0,40%; 0,35%; 0,30%, 0,20%; e 0,10%.

Para a verificação da diferença qualitativa entre as amostras do teste de F.O. foram identificados 13 tubos secos de vidro (medindo 16x100), em duplicata, aos quais foram incluídos 5mL de solução de NaCl em diferentes concentrações seguido da adição de 20µL da amostra por tubo de cada paciente, tanto para as amostras a fresco como para as amostras processadas após incubação a 37°C em banho-maria por 24 horas. Posteriormente, esses tubos foram homogeneizados e postos em repouso por 30 minutos, em seguida centrifugados por 5 minutos a 3.000rpm. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para cubetas para leitura em espectrofotômetro de luz com filtro de 540nm de comprimento de onda, para obtenção das concentrações do grau de hemólise de cada tubo e confecção das curvas de fragilidade osmótica.

Hemograma

As amostras que apresentavam solicitação médica de teste de F.O. e hemograma (n=14) foram submetidas a análise no equipamento de automação em hematologia BC6000® da marca Mindray, com posterior confecção de esfregaços sanguíneos, coloração das lâminas com corante de May Grunwald®, da empresa Merck, e análise morfológica por microscopia de luz comum com objetiva de imersão por profissional especializado do referido laboratório.

Análise estatística

Todos os dados foram tabulados e submetidos a métodos de estatística descritiva para definições de média, desvio padrão, mediana, e valores de mínimo e máximo,

além de teste não paramétrico, teste Extato de Fisher, para amostras independentes através do uso do software Bioestat 5.0. Considerou-se como significativo os valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Das 20 amostras analisadas, 17/20 (85%) eram de pacientes do gênero feminino. Quanto à idade, 5/20 (25%) tinham entre 3 meses e 7 anos; 1/20 (5%) tinha 13 anos; 6/20 (30%) tinham entre 25 a 41 anos; e 8/20 (40%) tinham idades entre 52 a 75 anos. Desses pacientes apenas 14/20 realizaram hemograma juntamente com o teste de F.O., onde observou-se que os mesmos apresentaram medianas de: 11,0g/dL de hemoglobina; $3.925 \times 10^6/\text{mm}^3$ de eritrócitos; 86,0fl de VCM; e de 33,0fl de CHCM.

No que tange aos resultados dos testes de F.O. para as amostras desses pacientes observou-se que em 9/20 (45%) dos casos o teste de F.O. foi concordante ao mesmo tempo para amostras a fresco e após incubação a 37°C. Sendo 6/9 concordantes quanto à normalidade (Grupo 1); 1/9 concordantes quanto à resistência (Grupo 2); e 2/9 concordantes quanto à fragilidade (Grupo 3) dos eritrócitos

submetidos às várias concentrações de NaCl (Quadro 1).

Para os demais 11/20 (55%) casos, os resultados do teste de F.O. foram discordantes quanto às amostras processadas a fresco ou após incubação a 37°C. Para essas amostras observou-se que: para 8/11 (72,7%) amostras houve resultado de fragilidade dos eritrócitos à hemólise no teste de F.O. processadas a fresco e curva normal (sem hemólise) para amostras processadas após incubação a 37°C por 24 horas. O mesmo foi observado para 3/11 (22,3%) amostras que apresentaram curva normal (sem hemólise) dos eritrócitos no teste com amostras processadas a fresco e resistência à hemólise dos eritrócitos para as mesmas amostras processadas após incubação a 37°C por 24 horas.

Diante desses resultados foi aplicado teste Extato de Fisher, o qual mostrou não haver diferença estatística ($p = 0,5743$) entre os resultados das amostras processadas a fresco ou após incubação a 37°C para resultados iguais (normal ou alterado) ou discordantes. Na Figura 1 são apresentadas as curvas dos testes de F.O. para amostras a fresco ou incubadas a 37°C (linhas em vermelho) quanto à normalidade (1A e 1B), fragilidade (1C e 1D) ou resistência à hemólise dos eritrócitos testados (1E e 1F).

Quadro 1 - Quadro de distribuição dos pacientes submetidos a teste de fragilidade osmótica que tiveram resultados concordantes ou discordantes para amostras processadas imediatamente (a fresco) ou após incubação por 24 horas a 37°C.

Grupos		Pacientes	Hb (g/dL)	Eritroc (X 10 ⁶ /mm ³)	VCM (fl)	CHCM (fl)	AF	37°
Concordantes (n=9)	Normal (n=6)	A-04	11,7	3.700	94,3	33,5	N	N
		A-05	11,0	3.720	86,3	34,3	N	N
		A-07	12,0	3.850	93,2	33,4	N	N
		A-08	11,8	4.250	82,1	33,8	N	N
		A-09	-	-	-	-	N	N
		A-13	11,3	3.930	83,2	34,6	N	N
	Resistentes (n=1)	A-06	11,7	5.220	71,6	32,0	R	R
	Frágeis (n=2)	A-16	-	-	-	-	F	F
		A-18	11,0	3.920	86,0	32,6	F	F
Discordantes (n=11)	(n=8)	A-01	-	-	-	-	F	N
		A-02	9,0	3.050	90,2	32,7	F	N
		A-03	13,0	4.360	90,6	32,9	F	N
		A-11	-	-	-	-	F	N
		A-14	10,3	3.230	95,0	33,6	F	N
		A-15	10,7	3.580	89,4	33,4	F	N
		A-19	-	-	-	-	F	N
		A-20	12,3	4.180	81,6	36,1	F	N
	(n=3)	A-10	11,0	5.810	58,7	32,3	N	R
		A-12	9,6	4.840	65,7	30,2	N	R
		A-17	-	-	-	-	N	R

Legenda: Amostra a fresco (AF); Amostra analisada após incubação por 24 horas a 37°C (37°C); Hemoglobina (Hb); Eritrócitos (Eritroc); Volume Corpuscular Médio (VCM); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio (CHCM); gramas por decilitros (g/dL); fentolitros (fl); Teste de Fragilidade Osmótica: Normal (N), com eritrócitos frágeis (F), ou com eritrócitos resistentes (R) a hemólise

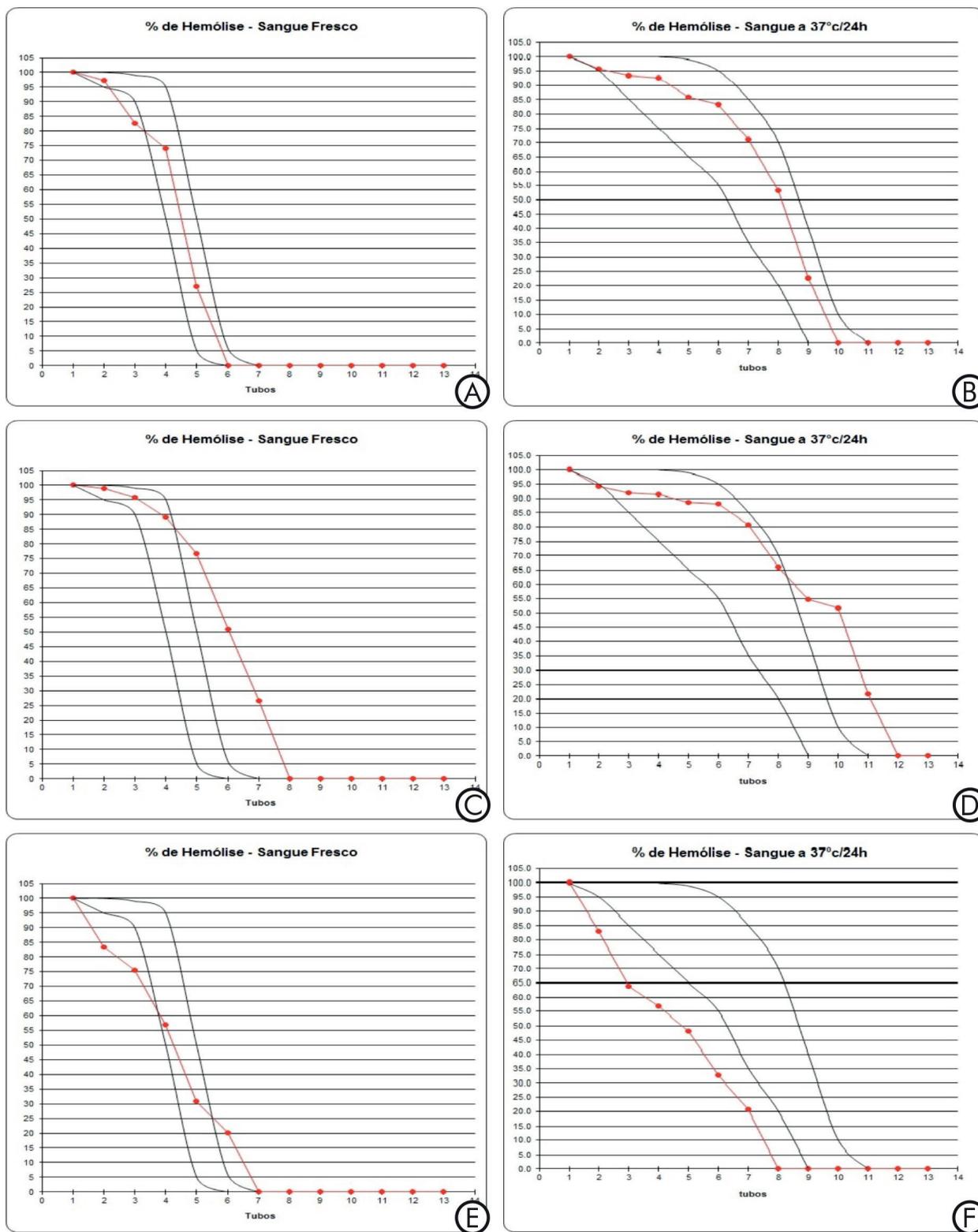


Figura 1. Curvas dos testes de fragilidade osmótica correspondentes a amostras normais (A e B), frágeis (C e D) e resistentes (E e F) processadas a fresco ou após incubação por 24 horas a 37°C.

Legenda: Curvas em preto (referência de normalidade); Curvas em vermelho (resultantes das amostras testadas); Escala do eixo X - concentrações crescentes de NaCl sendo (1) a menor concentração (0,1% de NaCl) e (13) a maior concentração de NaCl (0,9%); Escala do eixo Y - grau de hemólise.

As anemias hereditárias por deficiência de proteínas de ligação entre membrana celular e citoesqueleto, embora sejam mais frequentemente diagnosticadas na primeira infância, por vezes podem ser motivo de investigação em indivíduos adultos ou mesmo idosos, isso porque alguns desses pacientes podem passar parte da vida como assintomáticos ou portadores de quadros leves de anemia em um primeiro momento e em outro apresentar episódios hemolíticos graves, como ocorre na eliptose hereditária e a ovalocitose hereditária.⁽²¹⁾ Em nosso estudo observamos que 40% (8/20) dos pacientes que realizaram o teste de F.O. para pesquisa desses tipos de anemias encontravam-se na faixa etária de 52 a 75 anos, sugerindo assim a importância de um prescritor experiente e atento à pesquisa dessas anemias mesmo em adultos ou idosos.

Em relação à técnica convencional para o teste de fragilidade osmótica⁽¹⁻⁴⁾ essa inclui a análise de uma amostra de sangue periférico processada a fresco e outra processada após incubação por 24 horas em banho-maria a 37°C, sendo essa última a que apresenta os melhores resultados na caracterização da hemólise em pacientes portadores de esferocitose hereditária, ou de outras formas de anemia hemolítica por alteração de proteínas de ligação do complexo juncional membrana celular e citoesqueleto, em função de expor os eritrócitos deficientes da amostra a estresse metabólico por 24 horas, em condições extracorpóreas, o que acentua as deficiências proteicas dos eritrócitos e facilita a interpretação da curva.^(14,15,17-21)

Em nosso estudo também observamos que a análise das amostras após incubação a 37°C por 24 horas foi mais assertiva que a análise das amostras a fresco para o teste de fragilidade osmótica. Contudo, como já apresentado, não houve diferença estatística para as amostras processadas a fresco ou após incubação a 37°C.

A maior assertividade do teste de fragilidade osmótica para amostras analisadas após incubação por 24 horas em banho-maria a 37°C, contudo, ganha ainda maior importância quando analisada em associação com a concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e coeficiente de hemoglobina corpuscular médio (CHCM).^(11,12,25,26) Principalmente quando ocorrem discordâncias entre os resultados do teste de F.O. para amostras analisadas a fresco ou após incubação por 24 horas a 37°C, como foi observado, por exemplo, nos pacientes A6, A10 e A12, os quais apresentavam redução de VCM e resistência dos eritrócitos nas amostras testadas ao teste de F.O. após incubação por 24 horas em banho-maria a 37°C. O mesmo foi observado para os pacientes que apresentavam VCM normal e teste de F.O. também normal após incubação por 24 horas em banho-maria a 37°C.

Ainda assim muitos interferentes são associados à técnica convencional do teste de F.O., de modo que muitos foram os esforços traçados ao longo da última

década no sentido de criar uma metodologia que desse a esse teste maior especificidade e sensibilidade. Assim foi desenvolvida a metodologia de citometria de fluxo que utiliza eosina-5-maleimida, um corante fluorescente que reage covalentemente com a lisina-430 na primeira alça extracelular de domínio N-terminal da proteína banda-3, que por sua vez interage com a anquirina e a proteína 4.2 que interagem com o citoesqueleto celular através da espectrina e estabilizam a bicamada lipídica da membrana. Desta forma, essa metodologia mede a proporção de eritrócitos residuais após a indução de hemólise, por citometria de fluxo, a partir da ausência ou diminuição da expressão de proteínas da membrana dos eritrócitos que causa ruptura da rede proteica do citoesqueleto e a redução da expressão normal da proteína banda-3 na membrana dos mesmos resultando em redução da ligação da eosina-5-maleimida com a proteína banda-3 e, conseqüentemente, menor emissão de fluorescência, caracterizando assim a deficiência dessas proteínas.⁽¹⁰⁻¹³⁾

El Gendy, Hassab, Ghanem, Lewis e Nawar,⁽¹²⁾ em seus estudos com portadores de esferocitose hereditária (ES), e utilizando o teste de F.O. convencional e por citometria de fluxo como metodologias diagnósticas, mostraram que: quando o teste de F.O. foi o convencional, 20% dos pacientes com ES foram negativos para amostras processadas a fresco e depois todos foram positivos após incubação de 24 horas, comprovando a importância da realização da incubação para melhorar a sensibilidade do teste; e que quando a execução do teste de F.O. foi por citometria de fluxo, houve maior vantagem no diagnóstico dos casos leves de EH, menor tempo de execução e resultado final da técnica (2 a 3 horas), e menor interferência no resultado do teste mesmo quando os eritrócitos estavam diminuídos de tamanho, mas sem deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoesqueleto, como por exemplo na deficiência de ferro.

Isto sugere, assim, que o teste de F.O. por citometria de fluxo pode ser usado como o primeiro teste de triagem para EH, desde que a morfologia eritrocitária e a história familiar também sejam levadas em consideração.⁽¹⁰⁻¹³⁾ Contudo, a disponibilidade da técnica de citometria de fluxo para o diagnóstico de anemias por deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoesqueleto não é a realidade de muitos laboratórios espalhados no imenso território brasileiro.

Assim, entendemos que mesmo o teste de F.O. convencional ainda apresentando limitações em relação à metodologia por citometria de fluxo, trata-se de um método simples, de baixo custo e de grande importância para triagem e diagnóstico de portadores de anemias por deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoesqueleto.^(7-9,14,15,17-21) Contudo, na nossa opinião, de modo a agilizar o teste de F.O. convencional e melhorar a

sua especificidade, a técnica deveria ser realizada apenas para amostras processadas após a incubação por 24 horas a 37°C em banho-maria.

CONCLUSÃO

O teste de F.O. convencional se mostrou mais eficiente, qualitativamente, quando a amostra testada foi analisada após incubação por 24 horas a 37°C em banho-maria. Contudo, não houve diferença estatística para resultados processados a fresco ou após incubação a 37°C. Ainda assim, nossa opinião é que o teste de F.O. para amostras a fresco deveria ser abolido da rotina dos laboratórios de análises clínicas, garantindo assim maior segurança e confiabilidade dos resultados.

AGRADECIMENTO

Ao Laboratório de Patologia Clínica Dr Paulo C. Azevedo pelo apoio logístico das Dras Camila Brito e Monyque Ribeiro pelas contribuições durante a realização deste estudo.

Abstract

Objective: Qualitatively analyze the osmotic fragility test (O.F.) for samples fresh or after incubation at 37°C. **Methods:** Twenty peripheral blood samples were processed, collected in duplicate with 5 ml in each tube with heparin, from patients with O.F. request. as a routine examination for fresh processing and after incubation for 24 hours in a water bath at 37°C, in 13 tubes with varying concentrations of 0.1% to 0.9% NaCl. **Results:** Twenty samples of patients were analyzed, mostly female, 17/20 (85%), aged between 3 months to 75 years, for the O.F. test. The qualitative analysis of the results showed that only 9/20 (45%) samples had a consistent result between the F.O. tests for fresh samples and after incubation at 37°C. From the discordant results, 8/11 (72.7%) results show fragility of erythrocytes to hemolysis in fresh samples and normal curve (without hemolysis) after sample incubation at 37°C. Other 3/11 (22.3%) results showed normal curve (without hemolysis) in the test with fresh sample and resistance to hemolysis in the test with the sample after incubation at 37°C. With the Fisher Exact test showing no statistical difference ($p=0.5743$) for samples processed fresh or after incubation at 37°C. **Conclusion:** The O.F. proved to be more efficient when the tested sample was analyzed after incubation for 24h at 37°C in a water bath, however, there was no statistical difference for results processed fresh or after incubation at 37°C.

Keywords

Hemolytic Anemia; Osmotic Fragility; Hemolysis

REFERÊNCIAS

- Ryall RG, Chittleborough AJ, Kane A. A microtechnique for measuring red cells osmotic fragility of infants. *J. Clin. Pathol.* 1978;31:878-882.
- Caire AC, Gileno MC. Padronização e aplicação da curva de fragilidade osmótica auxílio diagnóstico de anemias. *Rev. Bras. Multidisciplinar.* 2012; 15(2):49-58. doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2012.v15i2.88.
- Massaldi HA, Richieri GV, Mel HC. Osmotic Fragility Model For Red Cell Populations. *Biophys. J.* 1988;54:301-308.
- Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: A new parameter for determination of the osmotic properties of human blood cells. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:1-6. doi: 10.1155/2014/162102.
- Bactor FN, Dorion RP. Malaria and hereditary elliptocytosis. *Am. J. Hematol.* 2008;83(9):753.
- Maiworm AI, Presta GA, Santos-Filho SD, De Paoli S, Giani TS, Fonseca AS, Bernardo-Filho M. Osmotic and morphologic effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;18(1):42-46.
- Duarte AE, Waczuk E, Roversi K, da Silva MA, Barros LM, da Cunha FA, de Menezes IR, da Costa JG, Boligon AA, Ademiluyi AO, Kamdem JP, Rocha JB, Burger ME. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiadenon echinus* (Ness & Mart.) Schauer. *Molecules.* 2016;21(1):2. doi.org/10.3390/molecules21010002
- Seibert CS, Guerra-Shinohara EM, Carvalho EG, Marques EE. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Collossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Acta Scientiarum.* 2001;23(2):515-520.
- Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas.* 2009;22(1):7-16.
- Warang P, Gupta M, Kedar P, Ghosh K, Colah R. Flow cytometric osmotic fragility - An effective screening approach for red cell membranopathies. *Cytometry Part B* 2011; 80B: 186–90. https://doi.org/10.1002/cyto.b.20583
- Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis—2011 update. *Br J Haematol.* 2012;156(1):37-49. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x.
- El Gendy W, Hassab HM, Ghanem AM, Lewis IM, Nawar SM. The application of eosin maleimide-binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis among undiagnosed cases of chronic hemolytic anemia in children. *Egypt J Haematol* 2014; 39: 109-13. doi: 10.4103/1110-1067.148229
- Park SH, Park CJ, Lee BR, et al. Comparison study of the eosin-5'-maleimide binding test, flow cytometric osmotic fragility test, and cyrohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Am J Clin Pathol.* 2014;142:474-484. doi: 10.1309/AJCPO7V4OGXLIIPP.
- Zaidi AU, Buck S, Gadgeel M, Herrera-Martinez M, Mohan A, Johnson K, Bagla S, Johnson RM, Ravindranath Y. Clinical Diagnosis of Red Cell Membrane Disorders: Comparison of Osmotic Gradient Ektacytometry and Eosin Maleimide (EMA) Fluorescence Test for Red Cell Band 3 (AE1, SLC4A1) Content for Clinical Diagnosis. *Front Physiol.* 2020. 19;11:636. doi: 10.3389/fphys.2020.00636.
- An X, Mohandas AND. Disorders of red cell membrane. *British J. Haematol.* 2008;141(3):367-75.
- Penman BS, Gupta S, Weatherall DJ. Epistasis and the sensitivity of phenotypic screens for beta thalassemias. *British J. Haematol.* 2015;169(1):1117-1128.
- Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013;27(4):167-78.
- Reis DB, Eid KAB, Pinto LM, Neumann MMA. Esferocitose hereditária no período neonatal: relato de caso e revisão de literatura. *Rev. Cien. Med.* 1996;5(3):119-23.
- Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, Zaninoni A, Zanella A. Hereditary red cell membrane defects diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus.* 2011;9(3):274-77.
- Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hem.* 2017;39(1):47-52. doi: 10.1111/ijlh.12657.
- Denadai R, Capelluppi-Tófano VA. Eliptocitose hereditária diagnosticada em paciente idosa. Relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Clin. Med.* 2012;10(5):450-454.

22. Pinto WJ, Marialva JE, Cardoso SMG, Areas MA. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. *Rev. Ciênc. Med. Biol.* 2013;12(1):106-120.
23. Khoshbin AR, Mohamadabadi F, Vafaeian F, Babania A, Akbarian S, Khandozi R, Sadrebazaz MA, Hatami E, Joshaghani HR. The effect of radiotherapy and chemotherapy on osmotic fragility of red blood cells and plasma levels of malondialdehyde in patients with breast cancer. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2015;20(4):305-308.
24. Kattamis C, Efremov G, Pootrakul S. Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting beta-thalassaemia trait. *J. Med. Genet.* 1981;18(4):266-70.
25. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol* 2013; 35: 237-43.
26. Crisp RL, Gammella D, Solari L, Rapetti MC, Schvartzman G, Donato H. Utilización de sangre capilar: Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria. *Hematología* 2013; 17: 8-14.

Correspondência

Prof Dr Lacy Cardoso de Brito Júnior
Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Patologia Geral -
Imunopatologia e Citologia (sala 303).
Av. Augusto Corrêa n°1.
CEP - 66075900, Bairro Guamá.
Belém, Pará, Brasil
Tel.:55 91 3201 71 02

Prevalência de bastonetes Gram-negativos não fermentadores isolados em amostras de hemoculturas

Prevalence of non-fermenter Gram-negative bacilli isolated in blood culture samples

Mayara Silveira Leal¹

Adrieli Alves Carneiro²

Patrícia Guedes Garcia³

Resumo

Objetivos: Avaliar a prevalência de bactérias não fermentadoras em amostras de hemoculturas provenientes das Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) adulto e neonatal e da Unidade Coronariana (UC); definir o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas bacterianas prevalentes. **Métodos:** Foram coletados dados de todas as hemoculturas positivas das UTIs Adulto, Neonatal e UC de um hospital privado, em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, de janeiro de 2017 a janeiro de 2019. **Resultados:** Foram analisados 3.535 resultados de amostras de hemoculturas onde 2.464 (69,7%) foram negativas e 1.071 (30,3%) positivas para algum microrganismo. Dentre as amostras positivas foram encontrados 77 bastonetes Gram-negativos não fermentadores (6,9%), com a prevalência de *Acinetobacter baumannii* (51,9%) seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (32,5%). As cepas de *A. baumannii* foram resistentes aos carbapenêmicos e às quinolonas. Quanto às cepas de *P. aeruginosa*, as drogas testadas que apresentaram maior resistência foram a ampicilina, ampicilina com tazobactam, as cefalosporinas de segunda e terceira geração, exceto ceftazidima; e a tigeciclina. As drogas que apresentaram boa atividade na inibição do crescimento das cepas analisadas foram tigeciclina para *A. baumannii* e colistina para ambas as cepas. **Conclusão:** o presente estudo alerta para a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos das cepas advindas das UTIs e UC, demonstrando um cenário preocupante e a necessidade de desenvolvimento de novas drogas e novas medidas de controle.

Palavras-chave

Hemocultura; Sepsis; Resistência Microbiana a Medicamentos; Infecções por Bactérias Gram-negativas

INTRODUÇÃO

As infecções de corrente sanguínea (ICS), de condição clínica grave, são responsáveis por elevada taxa de morbimortalidade.^(1,2) Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre os pacientes com ICS, 40% deles evoluem a óbito.

A presença de agente infeccioso na circulação promove uma resposta inflamatória sistêmica, à qual dá-se o nome de sepse.⁽³⁾ A sepse, uma vez instalada, promove uma disfunção orgânica e coloca em risco a vida do paciente.^(2,4-7) Essa síndrome é considerada um grande problema de saúde pública em unidades de terapia intensiva (UTIs), pois

é uma das principais causas de mortalidade no mundo e, por isso, foi listada como uma prioridade global da saúde pela Organização Mundial de Saúde (OMS).⁽⁸⁾ Além disso, incorre em aumento dos custos hospitalares e prolonga o tempo de internação, onerando os sistemas de saúde.^(1,9,10)

A detecção de microrganismos viáveis na circulação é realizada pelo exame de hemocultura, que é padrão-ouro para o diagnóstico da bacteremia.^(2,5,6,11) Sendo assim, a hemocultura é considerada um exame com elevado valor preditivo de infecção e, portanto, é um relevante indicador de ICS. A identificação do patógeno causador da infecção torna-se extremamente necessária para a escolha da correta terapia antimicrobiana.^(5,6) De acordo com Nieman et al.

¹ Especialista em Análises Clínicas/Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora.

² Microbiologista/ Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora.

³ Doutora/ Universidade Federal de Juiz de Fora.

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Recebido em 17/05/2020

Aprovado em 02/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.202001994

(2016),⁽²⁾ o rápido diagnóstico da sepse e o início precoce do tratamento reduz significativamente a morbimortalidade, com uma taxa de sobrevida de 80%.

Diversos microrganismos podem provocar as ICS, e dentre eles encontram-se as bactérias Gram-negativas não fermentadoras. Essas bactérias são facilmente encontradas no ambiente e são cada vez mais isoladas nas amostras clínicas. Especialmente em pacientes imunocomprometidos, as bactérias não fermentadoras agem como patógenos oportunistas e são difíceis de tratar devido a sua resistência a diversas classes de antimicrobianos.⁽¹²⁾

Perante o exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a prevalência de bactérias não fermentadoras, isolados em amostras de hemoculturas de indivíduos provenientes das UTIs e UC de um hospital privado de Juiz de Fora – MG. Também faz parte do objetivo do presente trabalho investigar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas bacterianas prevalentes visando contribuir para pesquisas na área de prevenção das ICS, além do incentivo ao uso racional de medicamentos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo, em que os dados analisados foram coletados no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2019.

Como critério de inclusão considerou-se todas as amostras de hemoculturas cujos resultados foram positivos para microrganismos Gram-negativos não fermentadores. Os dados que fazem parte da pesquisa foram obtidos através dos arquivos digitais do software laboratorial Shift Lis® utilizado pelo laboratório do referido hospital.

As hemoculturas incluídas no presente estudo foram previamente detectadas de forma automatizada pelo aparelho BACT/ALERT® 3D 60 da empresa bioMérieux, com posterior identificação e antibiograma no sistema VITEK® 2 compact da bioMérieux com os cartões de identificação GN para Gram-negativos fermentadores e não fermentadores e com cartões de antibiograma AST-238 e AST-239.⁽¹³⁾

Esse estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – CEP/FCMS-JF, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sob o Parecer nº 3.735.713.

Análise estatística

As análises descritivas dos dados foram realizadas utilizando o Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS

Foram analisados resultados de 3.535 amostras de hemoculturas provenientes das UTIs e UC no período de

dois anos, sendo 2.591 (73,3%) da UTI adulto, 539 (15,2%) da UTI neonatal e 405 (11,5%) da UC. Do total de amostras, 1.071 (30,3%) apresentaram crescimento positivo e destas, 44 (4,1%) apresentaram crescimento de pelo menos dois microrganismos, totalizando 1.116 cepas. No entanto, apenas 77 cepas (6,9%) eram de bactérias não fermentadoras, logo, esses foram os resultados contemplados no presente estudo.

Do total de amostras positivas, 80,8% (866) eram provenientes da UTI adulto. Dos Gram-negativos não fermentadores contemplados na pesquisa, 91% (70) também foram provenientes da mesma unidade; enquanto 5,1% (4) eram da UTI neonatal e 3,9% (3) da UC.

O gráfico 1 mostra a prevalência de bactérias não fermentadoras isoladas nas amostras de hemoculturas dos pacientes da UTI adulto. Foram isoladas 40 cepas de *Acinetobacter baumannii* (57,1%), 20 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (28,6%), 5 cepas de *Pseudomonas* spp. (7,1%), 2 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (2,9%), 2 cepas de *Acinetobacter* spp. (2,9%) e 1 cepa do Complexo *Burkholderia cepacia* (1,4%).

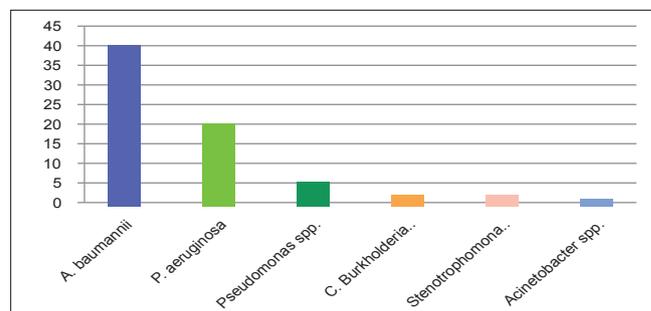


Gráfico 1. Prevalência de bactérias não fermentadora na UTI adulto.

Fonte: elaborada pelos autores

Os dados de prevalência das bactérias não fermentadoras identificadas nas hemoculturas da UTI neonatal e da UC estão representados no Gráfico 2.

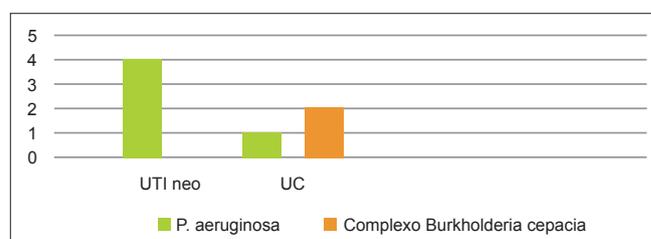


Gráfico 2. Prevalência de bactérias não fermentadoras na UTI neo e na UC.

Fonte: elaborada pelos autores

Após a análise dos Gráficos 1 e 2, foi possível determinar a prevalência geral das bactérias não fermentadoras nas UTIs e UC. Foram isoladas 40 cepas de *A. baumannii*

(51,9%) e 25 cepas de *P. aeruginosa* (32,5%). Outros Gram-negativos não fermentadores foram isolados em menor quantidade, sendo eles: 5 cepas de *Pseudomonas* spp. (6,5%), 3 cepas do Complexo *Burkholderia cepacia* (3,9%), 2 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (2,6%) e 2 de *Acinetobacter* spp. (2,6%) conforme o Gráfico 3.

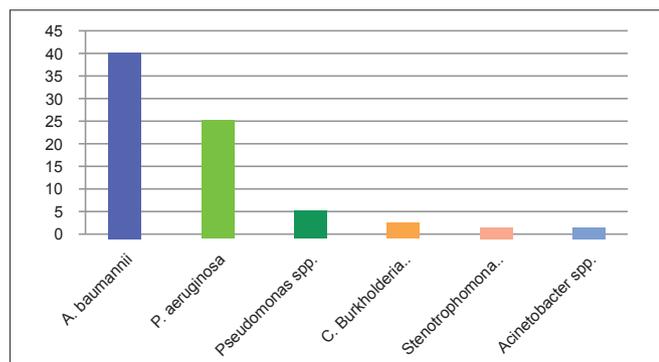


Gráfico 3. Prevalência geral de bactérias não fermentadora nas UTIs e UC.

Fonte: elaborada pelos autores

As cepas de *A. baumannii* mostraram sensibilidade reduzida à maioria dos antimicrobianos testados onde 100% delas apresentaram-se resistentes às penicilinas; 88,5% às cefalosporinas; 87,5% aos carbapenêmicos; 85,0% às quinolonas e 72,5% à penicilina associada ao inibidor de β-lactamase. Apesar da resistência às diversas classes de antimicrobianos, a colistina foi o agente antimicrobiano mais ativo, seguido pela tigeciclina, com sensibilidade de 100% e 80%, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Perfil de suscetibilidade *Acinetobacter baumannii*.

	R	I	S
AMP/CFU	40/40 (100%)		
CFO	39/40 (97,5%)		
COM	36/40 (90,0%)		3/40 (7,5%)
IMI	35/40 (87,5%)		4/40 (10,0%)
CIP	34/40 (85,0%)		4/40 (10,0%)
CAZ	33/40 (82,5%)	3/40 (10,0%)	2/40 (5,0%)
CRO	29/40 (72,5%)	10/40 (25,0%)	1/40 (2,5%)
APS	29/40 (72,5%)	6/40 (15,0%)	4/40 (10,0%)
GEN	16/40 (40,0%)	4/40 (10,0%)	16/40 (40,0%)
TIG		7/40 (17,5%)	32/40 (80,0%)
COL			40/40 (100%)

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMP – Ampicilina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacino; CFO – Cefoxitina; COL – Colistina; CPM – Cefepime; CRO – Ceftriaxona; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; APS – Ampicilina com sulbactam; TIG – Tigeciclina.

As cepas de *P. aeruginosa* estudadas apresentaram sensibilidade reduzida à maioria das cefalosporinas, com resistência variando de 96% (cefotaxima) a 100% (cefuroxima). Ainda em relação às cefalosporinas, mais da metade das cepas apresentaram resistência à ceftazidima e ao cefepime (52%). Dos aminoglicosídeos testados, a resistência foi de aproximadamente 60% à gentamicina. No grupo das penicilinas, 100% das cepas foram resistentes à ampicilina e 96% à ampicilina associada com tazobactam. Em relação à tigeciclina, 96% das cepas foram resistentes. A colistina foi o antimicrobiano que apresentou maior sensibilidade contra as cepas de *P. aeruginosa* com 96% de sensibilidade, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade *Pseudomonas aeruginosa*.

	R	I	S
AMP/CFU/ CRO	25/25 (100%)		
CFO/APS/ TIG	24/25 (96,0%)		
CIP	15/25 (60,0%)		10/25 (40,0%)
GEN	16/25 (60,0%)		9/25 (36,0%)
CAZ	13/25 (52,0%)		10/25 (40,0%)
COM	13/25 (52,0%)	4/25 (16,0%)	8/25 (32,0%)
MER	12/25 (48,0%)		13/25 (52,0%)
IMI	11/25 (44,0%)		13/25 (52,0%)
AMI	10/25 (40,0%)		15/25 (60,0%)
COL			24/25 (96,0%)

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMI – Amicacina; AMP – Ampicilina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacino; CFO – Cefoxitina; CFU – Cefuroxima; COL – Colistina; CPM – Cefepime; CRO – Ceftriaxona; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; APS – Ampicilina com sulbactam; TIG – Tigeciclina.

DISCUSSÃO

A taxa de positividade das hemoculturas observadas no presente estudo foi de aproximadamente 30%, resultado similar ao descrito por Rodriguez et al. (2011)⁽¹⁴⁾ e La Rosa et al. (2016)⁽¹⁵⁾ cuja positividade encontrada foi de aproximadamente 36%; e, foi superior aos 20% de positividade observado por Morello et al. (2019).⁽¹⁶⁾ A taxa de positividade das hemoculturas varia de 10% a 30%.^(17,18) Portanto, é possível afirmar que os resultados obtidos no estudo em questão foram compatíveis com a literatura.

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores mais isolados nas UTIs foram *Acinetobacter baumannii* (51,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (32,5%).

A prevalência das bactérias não fermentadoras encontrada foi semelhante à reportada por Chmielarczyk et al. (2018),⁽¹⁹⁾ que também observaram *A.baumannii* e *P. aeruginosa* como prevalentes nas unidades de terapia intensiva.

As cepas de *A. baumannii* são intrinsecamente resistentes às penicilinas e praticamente resistentes a todos os antimicrobianos usados para tratar as infecções causadas por bactérias Gram-negativas, como os pertencentes às classes de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cefalosporinas.⁽²⁰⁾ A resistência múltipla fez com que os carbapenêmicos se tornassem a droga de escolha para o tratamento de infecções provocadas por esses microrganismos.⁽²²⁾ No entanto, Mota et al. (2018)⁽²³⁾ descreveram em seu estudo uma taxa de resistência importante ao imipenem de 77,1% e dados da ANVISA apontam 80% das ICS por *A. baumannii* sendo resistentes aos carbapenêmicos.

No presente estudo, a taxa de resistência ao imipenem foi de 87,5%, corroborando com o estudo realizado por Mota et al. (2018).⁽²³⁾ Também observamos uma elevada taxa de resistência às cefalosporinas de 2ª, 3ª e 4ª geração e às quinolonas sendo semelhante às descritas por Gomes et al. (2016).⁽²⁴⁾

A colistina foi o antimicrobiano mais ativo contra as cepas de *A. baumannii*, onde 100% das cepas apresentaram-se sensíveis, taxa semelhante à apresentada por Gales et al. (2019),⁽²⁰⁾ seguido pela tigeciclina, cuja sensibilidade foi de 80%, corroborando com os estudos de WU et al. (2018),⁽²¹⁾ cuja sensibilidade foi de 100%.

Em relação às cepas de *P. aeruginosa*, as drogas que apresentaram maior resistência de acordo com Manyahi et al. (2020)⁽²⁵⁾ foram as cefalosporinas de 3ª geração, representada pela cefotaxima, cuja resistência foi de 100%. A suscetibilidade dessas cepas também foi reduzida em relação à gentamicina, à ceftazidima e ao ciprofloxacino, onde a taxa de resistência observada foi de 73%, 70% e 64%, respectivamente. Quanto aos carbapenêmicos, a resistência relatada foi de 46% para o meropenem.

No presente estudo a taxa de resistência, à ceftazidima foi de 52%, mostrando-se inferior à descrita por Manyahi et al. (2020).⁽²⁵⁾ Quanto aos aminoglicosídeos e ao ciprofloxacino, a taxa de resistência foi semelhante.

De acordo com Moyo et al. (2015),⁽²⁶⁾ o uso dos carbapenêmicos tem sido cada vez mais utilizado para tratar infecções por *P. aeruginosa* resistentes aos β -lactâmicos, entretanto o aparecimento de cepas resistentes a eles já tem sido observado assim como descrito por Aydin Teke et al. (2017)⁽²⁷⁾ que observaram uma resistência ao imipenem de aproximadamente 41% e por Manyahi et al. (2020)⁽²⁵⁾ que descreveram uma resistência ao meropenem de 46%; no presente estudo, a taxa de resistência observada foi de 44% ao imipenem e de 48% ao meropenem.

Segundo Fritzenwanker et al. (2018)⁽²⁸⁾ as cepas de *P. aeruginosa* são vistas como resistentes à tigeciclina, e no presente estudo esse também foi o antibiótico que apresentou uma elevada taxa de resistência.

Apesar do elevado grau de resistência associado às cepas de *P. aeruginosa*, algumas drogas apresentaram boa

taxa de suscetibilidade. Dentre os fármacos considerados antipseudomonias, a taxa de suscetibilidade foi de 60% para amicacina, semelhante à descrita por Dallacorte et al. (2016),⁽²⁹⁾ que foi de 57%; e em relação à colistina, a sensibilidade observada no presente estudo foi de 96%, taxa semelhante à observada por Kim et al. (2017)⁽³⁰⁾ e por Malekzadegan et al. (2019),⁽³¹⁾ que foi de 100%.

Em relação às cepas de *Burkholderia cepacia* prevalentes na UC, seu perfil de suscetibilidade não foi detalhadamente abordado, devido ao reduzido número de amostras nesta unidade e, portanto, não apresentou uma relevância significativa em relação ao número total de amostras analisadas. No entanto, é possível afirmar que no presente estudo, 100% das cepas isoladas nesta unidade foram sensíveis à sulfametaxazol com trimetropim e à ceftazidima, drogas de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias.

CONCLUSÃO

As bactérias não fermentadoras de maior prevalência foram *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi observada uma múltipla resistência em relação às quinolonas, β -lactâmicos, inclusive, carbapenêmicos.

Diante do surgimento de cepas com resistência a diversas classes de antimicrobianos, é de suma importância que haja um controle rigoroso por parte da equipe hospitalar, com medidas educativas que visem à prevenção das ICS e, conseqüentemente, promovam uma redução na disseminação desses microrganismos.

O relato do surgimento de cepas resistentes à colistina desafia ainda mais as medidas de controle de infecção e torna a investigação completa dos surtos uma ação indispensável. Medidas de biossegurança, como a higienização sistemática das mãos, é de grande importância no controle das infecções relacionadas à assistência à saúde.

Abstract

Objectives: To evaluate the prevalence of non-fermenting bacteria in blood culture samples from the adult and neonatal intensive care units (ICUs) and the Coronary Care Unit (CCU); define the antimicrobial susceptibility profile of prevalent bacterial strains. **Methods:** Data were collected on all positive blood cultures from the Adult, Neonatal and CCU ICUs of a private hospital in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, from January 2017 to January 2019. **Results:** 3535 results of blood culture samples were analyzed, where 2464 (69.7%) were negative and 1071 (30.3%) positive for some microorganism. Among the positive samples, 77 non-fermenting Gram negative rods (6.9%) were found, with the prevalence of *Acinetobacter baumannii* (51.9%) followed by *Pseudomonas aeruginosa* (32.5%). *A. baumannii* strains were resistant to carbapenems and quinolones. As for strains of *P. aeruginosa*, the drugs tested that showed greater resistance were ampicillin, ampicillin with tazobactam, second and third generation of cephalosporins, except ceftazidime; and tigecycline. The drugs that showed good activity in inhibiting the growth of the strains analyzed were tigecycline for *A. baumannii* and colistin for both strains. **Conclusion:** the present study

warns of resistance to multiple classes of antimicrobial strains from the ICUs and UC, demonstrating a worrying scenario and the need to develop new drugs and new control measures.

Keywords

Blood Culture; Sepsis; Bacterial Drug Resistance; Gram-negative Bacteria Infections

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017.
2. Nieman AE, Savelkoul PHM, Beishuizen A, Henrich B, Lamik B, MacKenzie CR, Kindgen-Milles D, Helmers A, Diaz C, Sakka SG and Schade RP. A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infectious Diseases* (2016) 16:314.
3. Mustafić S, Brkić S, Prnjavorac B, Sinanović A, Porobić Jahić H, Salkić S. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with sepsis. *Med Glas (Zenica)*. 2018;15(2):93–100. doi:10.17392/963-18.
4. Brooks D, Polubothu P, Young D, Booth MG, Smith A. (2018). Sepsis caused by bloodstream infection in patients in the intensive care unit: the impact of inactive empiric antimicrobial therapy on outcome. *Journal of Hospital Infection*, 98(4), 369–374. doi:10.1016/j.jhin.2017.09.031 .
5. Araujo MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação de resultados. *J Infect Control*. 2012; 1(1): 08-19.
6. Ferreira LE, Dalposso K, Hackbarth BB, Gonçalves AR, Westphal GA, França PHC et al. Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011; 23(1): 36-40.
7. Sitnik R, Marra AR, Petroni RC, Ramos OPS, Martino MDV, Pasternak J et al. Uso do SeptiFast para diagnóstico de sepse em doentes graves de um hospital brasileiro. *Einstein*. 2014; 12(2): 191-7.
8. Leal HF, Azevedo J, Silva GEO, et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: epidemiological, clinical and microbiological features. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):609. Published 2019 Jul 11. doi:10.1186/s12879-019-4265-z.
9. Cantón-Bulnes ML, Garnacho-Montero J. Practical approach to the management of catheter-related bloodstream infection. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32 Suppl 2 (Suppl 2):38–41.
10. da Costa TM, Cuba GT, Morgado PGM, et al. Pharmacodynamic comparison of different antimicrobial regimens against *Staphylococcus aureus* bloodstream infections with elevated vancomycin minimum inhibitory concentration. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):74. Published 2020 Jan 23. doi:10.1186/s12879-020-4782-9.
11. Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream Infections. (n.d.). Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host, Second Edition, 653–689. doi:10.1128/microbiolspec.dmh2-0031-2016.
12. Whistler T, Sangwichian O, Jorakate P, Sawatwong P, Surin U, Piralam B, et al. (2019) Identification of Gram negative non-fermentative bacteria: How hard can it be? *PLoS Negl Trop Dis* 13(9): e0007729. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007729>.
13. bioMérieux Brasil. Produtos e Serviços. Disponível em: URL: <http://www.biomerieux.com.br/diagnostico-clinico/produtos-e-servicos>. Acesso em 3 dezembro 2019.
14. Rodriguez F, Barrera L, De La Rosa G, Dennis R, Duenas C, Granados M, et al. The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals. *Crit Care Med*. 2011; 39(7):1675-82.
15. De La Rosa G, León AL, Jaimes F. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia [Epidemiology and prognosis of patients with bloodstream infection in 10 hospitals in Colombia]. *Rev Chilena Infectol*. 2016;33(2):141–149. doi:10.4067/S0716-10182016000200003
16. Morello LG, Dalla-Costa LM, Fontana RM, Netto AC, Petterle RR, Conte D, et al. Avaliação das características clínicas e epidemiológicas de pacientes com e sem sepse nas unidades de terapia intensiva de um hospital terciário. *Einstein (São Paulo)*. 2019; 17(2): eAO4476. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4476.
17. Chen XC, Yang YF, Wang R, Gou HF, Chen XZ. Epidemiology and microbiology of sepsis in mainland China in the first decade of the 21st century. *Int J Infect Dis*. 2015; 3: 9-14.
18. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study [published correction appears in *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jan 15;193(2):223-4]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(10):1147–1157. doi:10.1164/rccm.201412-2323OC
19. Chmielarczyk A, Pobjega M, Romaniszyn D, Wójkowska-Mach J. Multi-locus sequence typing (MLST) of non-fermentative Gram-negative bacilli isolated from bloodstream infections in southern Poland. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(2):191–196. doi:10.1007/s12223-017-0550-7.
20. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(Suppl 1):S34–S46. Published 2019 Mar 15. doi:10.1093/ofid/ofy293.
21. Wu HG, Liu WS, Zhu M, Li XX. Research and analysis of 74 bloodstream infection cases of *Acinetobacter baumannii* and drug resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(6):1782-1786. doi:10.26355/eurev_201803_14597
22. Al-Lawama M, Aljbour H, Tanash A, Badran E. Intravenous Colistin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter* in neonates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:8. Published 2016 Feb 12. doi:10.1186/s12941-016-0126-4.
23. Mota FS, Oliveira HÁ, Souto RCF. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Anal Clin*. 2018; 50(3): 270-2.
24. Gomes DBC, Genteluci GL, Carvalho KR, Medeiros LM, Almeida VC, Castro EAR, et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência de resistência à polimixina no Rio de Janeiro. *Rev Visa em Debate*. 2016;4(3):28.
25. Manyahi J, Kibwana U, Mgimba E, Majigo M. Multi-drug resistant bacteria predict mortality in bloodstream infection in a tertiary setting in Tanzania. *PLoS One*. 2020;15(3):e0220424. Published 2020 Mar 4. doi:10.1371/journal.pone.0220424.
26. Moyo S, Haldorsen B, Aboud S, Blomberg B, Marselle SY, Sundsfjord A, Langeland N and Samuelsen O. Identification of VIM-2-Producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania Is Associated with Sequence Types 244 and 640 and the Location of *bla*_{VIM-2} in a TniC Integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):682–685. doi:10.1128/AAC.01436-13.
27. Aydın Teke T, Tanır G, Bayhan GI, Öz FN, Metin Ö, Özkan Ş. Clinical and microbiological features of resistant gram-negative bloodstream infections in children. *J Infect Public Health*. 2017;10(2):211-218. doi:10.1016/j.jiph.2016.04.011.
28. Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T. Opções de tratamento para infecções Gram-negativas resistentes a Carbapenem. *Dtsch Arztebl Int*. 2018; 115 (20-21): 345-352. doi: 10.3238 / arztebl.2018.0345.

29. Dallacorte TS, Indras DM, Teixeira JJV, Peder LD, Silva CM. Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de hemoculturas realizadas em hospitais particulares. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo 2016; 75:1702.
30. Kim HS, Park BK, Kim SK, et al. Clinical characteristics and outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):500. Published 2017 Jul 17. doi:10.1186/s12879-017-2597-0.
31. Malekzadegan Y, Abdi A, Heidari H, Moradi M, Rastegar E, Sedigh Ebrahim-Saraie H. In vitro activities of colistin, imipenem and ceftazidime against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates in the south of Iran. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):301. Published 2019 May 28. doi:10.1186/s13104-019-4344-7.

Correspondência

Mayara Silveira Leal

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora
Alameda Salvaterra, 200 - Salvaterra, Juiz de Fora - MG, 36033-003
E-mail: myrsilveira@gmail.com

Correlação entre os métodos sorológico e molecular para detecção do HIV na triagem de doadores de sangue na Fundação HEMOPA

Correlation between serological and molecular methods for HIV detection in blood donor screening in HEMOPA Foundation

Carlos Eduardo de Melo Amaral¹

Luanne Rafaela Magalhães Cunha²

Valéria Lobato Macedo²

Resumo

Objetivo: Buscar a correlação entre os métodos sorológico e molecular para detecção do HIV na triagem de doadores de sangue na Fundação HEMOPA. **Métodos:** Realizou-se a busca das amostras reagentes para HIV, referente aos anos de 2015 a 2019 no Sistema de Banco de Sangue da Fundação HEMOPA. Para análise estatística, utilizou-se o programa SPSS para a comparação das medianas dos valores de S/CO com NAT detectável e indetectável. O teste de X^2 foi utilizado para apontar a correlação dos valores de S/CO com a presença do RNA viral. **Resultados:** Obtiveram-se para o estudo 910 amostras reagentes, na qual 75,60% (688/910) positivas (S/CO > 1,2) e 24,40% (222/910) inconclusivas (S/CO 0,8-1,2). A mediana de S/CO das amostras detectáveis foi de 503,93 e das indetectáveis foi de 1,22 no NAT. **Conclusão:** Estabelecemos que na triagem sorológica-molecular há uma correlação estatisticamente significativa, na qual a presença de anticorpos e/ou antígenos no teste ARCHITECH HIV Ag/Ab Combo orienta a predição de viremia no NAT.

Palavras-chave

HIV; Sorologia; Bancos de Sangue

INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980, o *Human Immunodeficiency Virus*/Vírus da imunodeficiência humana (HIV/VIH) é alvo de estudos na população mundial por ser o agente etiológico causador da *Acquired Immunodeficiency Syndrome*/Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS/SIDA), correspondendo a um grande impacto na saúde pública.⁽¹⁾

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e é classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2. O vírus é constituído por duas fitas de RNA de cadeia simples, é um vírus envelopado e apresenta como glicoproteínas de superfície gp160, gp120 e gp41. Em relação ao seu capsídeo viral, contém as proteínas p6, p9, p17 e p24 assim como as enzimas integrase e protease que originam as proteínas p31 e p10, respectivamente. É fundamental o conhecimento dessas proteínas virais, pois elas contribuem para a detecção de anticorpos nos testes sorológicos.⁽²⁾

O Ministério da Saúde estabelece diferentes sequências de procedimentos para o uso das metodologias de

diagnóstico para HIV, podendo ser testes para detecção de antígeno e/ou anticorpo, tendo como objetivo atender às diversas situações clínicas, a fim de uma conclusão segura no diagnóstico.⁽¹⁾ Em relação à transfusão em bancos de sangue, as metodologias empregadas para triagem do HIV estão em constante avanço, uma vez que se preza sempre pela segurança transfusional. Além disso, é evidenciada a triagem clínica nos bancos de sangue, além da triagem laboratorial, na qual é estabelecido, por meio da Portaria de consolidação nº 5, que os testes utilizados na triagem obtenham 100% de sensibilidade e maior que 99% de especificidade.⁽³⁾

A triagem para o HIV no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (Fundação HEMOPA) é realizada através da triagem sorológica-molecular, onde a triagem sorológica decorre de um imunoensaio de 4ª geração (quimioluminescência) que diminui a janela diagnóstica (tempo que decorre entre a infecção e a detecção de marcadores virais), sendo esta influenciada pela alta sensibilidade do teste.^(3,4) Diferentemente da triagem

¹ Doutor em Genética e Biologia Molecular/Universidade Federal do Pará (UFPA).

² Graduado(a) em Biomedicina/Centro Universitário Metropolitano da Amazônia.

Instituição: Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA). Belém, PA, Brasil.

Recebido em 19/10/2020

Aprovado em 23/09/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102077

molecular, que é realizada com o auxílio do *Nucleic Acid Test* (NAT), o qual detecta diretamente o ácido nucleico viral na revelação da detecção precoce de novos doadores ou doadores em soroconversão.^(3,5)

Na Fundação HEMOPA, utiliza-se o ensaio Abbott Architect HIV Ag/Ab, no qual é empregada a metodologia de quimioluminescência, sendo esta uma metodologia de diagnóstico de alta sensibilidade. Dessa forma, são detectados qualitativamente e simultaneamente os anticorpos anti-HIV-1/2 assim como o antígeno HIV p24 em amostras de soro ou plasma.⁽⁶⁾ A quantidade de antígenos e anticorpos presentes na amostra será determinada através de unidades relativas de luz (RLUs), sendo diretamente proporcionais. O resultado do teste sorológico é expresso a partir do sinal quimioluminescente como valores de uma relação sinal/ponto de corte (S/CO), estabelecido a partir da calibração do ensaio ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo.^(7,8)

Diante dos valores da relação S/CO é possível interpretar as amostras como reagentes e não reagentes. Quando uma amostra estiver com os valores da relação S/CO acima de 1,2 considera-se a amostra positiva. As amostras que obtiverem valores relação S/CO entre 0,8 até 1,2, são consideradas inconclusivas. Entretanto, segundo as informações do fabricante, pode-se considerar amostras reagentes que tenham sido positivas e inconclusivas. Quanto às amostras não reagentes, os valores da relação S/CO deve estar abaixo de 0,8.⁽⁷⁾

O teste molecular NAT foi introduzido na Fundação HEMOPA a partir de 2012, porém somente no ano de 2013 tornou-se obrigatório para testagem nos bancos de sangue, através da Portaria nº 2.712 de 2013.⁽⁹⁾ O teste NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos constitui uma metodologia multiplex de alta sensibilidade e especificidade baseada na detecção de ácidos nucleicos do agente infeccioso através da plataforma de PCR em tempo real, na qual detecta a infecção, diminuindo o tempo de janela diagnóstica de 30 dias para 10 a 12 dias (NAT-HIV) a partir do início da infecção, apresentando um papel essencial na identificação da viremia, principalmente quando encontrada em níveis baixos, resultando assim em um aumento da segurança transfusional.⁽⁵⁾ Embora seja um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), os resultados são expressos apenas qualitativamente como detectável e indetectável.^(5,10)

Em alguns casos, é possível observar resultados discrepantes, onde as amostras das bolsas de sangue que resultaram na triagem sorológica como reagente ou inconclusiva, no NAT podem resultar como indetectável para HIV. Para esse fim, recomenda-se que a amostra seja encaminhada para realização do teste confirmatório. Apesar disso, mesmo que o resultado do teste confirmatório seja negativo, a bolsa de sangue que originou a amostra é

descartada, pois apresentou um resultado alterado. Além disso, o provável doador se tornará inapto temporariamente, e poderá ser convocado para repetição do teste em uma nova amostra, a fim da mudança desta circunstância.⁽³⁾

Os testes sorológicos e moleculares que são utilizados em bancos de sangue têm uma grande importância para a sociedade, pois objetivam a identificação de forma precoce de indivíduos infectados, aumentando a segurança transfusional. Dessa forma, é possível observar que a utilização em conjunto desses testes na triagem contribui de forma significativa na identificação da infecção em um tempo mais curto.⁽¹¹⁾ Vale ressaltar que ao seguir a legislação que rege a segurança transfusional cabe aos bancos de sangue se responsabilizar pelo esclarecimento do resultado alterado, assim como levar à possibilidade de confirmação do mesmo com o intuito de garantir uma informação segura e auxiliar no acompanhamento de doadores inaptos.⁽³⁾

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo buscar a correlação entre os métodos sorológico e molecular para detecção do HIV na triagem de doadores de sangue na Fundação HEMOPA, de forma que seja possível associar os valores da relação S/CO e a presença de RNA viral na detecção do HIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo retrospectivo, quantitativo e descritivo na Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA), no laboratório de Biologia Celular e Molecular (GEBIM). Foi realizada a busca de dados no Sistema de Banco de Sangue (SBS *Web e Progress*) da Fundação HEMOPA, referente aos anos de 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Os sistemas informatizados do banco de sangue foram utilizados para o desenvolvimento da busca de resultados das amostras reagentes (inconclusivas e positivas) no teste sorológico (Quimioluminescência-ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo), em seguida ocorreu a busca do resultado do teste molecular (NAT HIV Bio-Manguinhos) para cada amostra.

Adotou-se como critérios de inclusão: resultados de amostras provenientes de candidatos a doações de sangue; amostras reagentes na triagem sorológica durante o período de 2015 a 2019, na qual se apresentaram como inconclusivas (S/CO 0,8-1,2) e positivas (S/CO >1,2). E como critérios de exclusão: amostras que se apresentaram como não reagentes; amostras procedentes de pacientes; amostras sem resultado de S/CO; amostras sem resultado do NAT; e duplicatas de amostras.

Para análise estatística de dados, os resultados das amostras foram digitalizados para uma planilha no banco de dados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 20, no qual foram organizados

e contabilizados. Em seguida, foi realizada a estatística descritiva, determinando as frequências absolutas e percentuais das variáveis qualitativas (resultados sorológicos – positivos, inconclusivos ou negativos, moleculares detectáveis ou indetectáveis).

Para a análise da correlação dos valores da relação S/CO com a presença de RNA viral realizou-se o teste de Qui-quadrado (X^2) com intervalo de confiança de 95% (p -valor menor ou igual a 0,05). Em relação às variáveis quantitativas (valores da relação S/CO) foram calculados os valores de média, desvio padrão e valores mínimos e máximos, de acordo com as características das variáveis em estudo. Realizou-se também o cálculo do ponto de corte do teste Quimioluminescência-ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo, assim como as informações de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foram obtidas por meio da análise gráfica gerada pela curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC).

ÉTICA

O referente estudo foi submetido à Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos e a todo o sistema Comitê de Ética e Pesquisa/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP), consistindo na aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Metropolitana da Amazônia – CEP/FAMAZ, sob o CAAE 26167219.70000.5701, com o Parecer nº 3.922.771 (anexo 1). Logo, foi autorizada a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) devido serem analisados somente os resultados referentes às amostras de doadores de sangue, adquiridos por meio de relatórios gerais. Em momento algum as identificações e/ou informações confidenciais foi revelada.

RESULTADOS

Foram coletadas no Banco de Sangue da Fundação HEMOPA, durante o período de 2015 a 2019, 482.176

bolsas de sangue, que deram origem a amostras a serem triadas; 0,20% dessas amostras foram reagentes para HIV pelo método de Quimioluminescência (ARCHITECH HIV Ag/Ab Combo).

Ao aplicar os critérios de exclusão, sucederam para este estudo 910 amostras. Dessas 910 amostras reagentes obtidas, 75,60% (688/910) obtiveram resultado positivo (S/CO > 1,2) e 24,40% (222/910) inconclusivo (S/CO 0,8-1,2). Com a investigação dos resultados do NAT HIV de cada amostra, observou-se que 100% (222/222) das amostras inconclusivas no teste sorológico resultaram como NAT HIV indetectável. Quanto às amostras positivas, 66,38% (456/688) procederam como NAT HIV detectável e 33,62% (232/688) dessas resultaram como NAT HIV indetectável. Assim, na visão geral do estudo, pode-se observar que 50,10% (456/910) das amostras reagentes foram NAT HIV detectável e 49,90% (454/910) NAT HIV indetectável.

Dessa forma, ao realizar a estatística descritiva dos valores de S/CO das amostras detectáveis e indetectáveis no NAT, observou-se que o valor da mediana S/CO das amostras NAT detectável foi 503,93 (mín - máx, 1,64 – 9752,00). O valor da mediana S/CO das amostras indetectáveis foi de 1,22 (mín - máx, 0,80 – 820,42). Foi analisada a diferença entre a mediana S/CO entre NAT detectável e NAT indetectável. Os valores encontrados foram significativamente mais elevados entre os detectáveis (503,93 vs. 1,22; U de *Mann-Whitney* = 2908,000; $p = 0,000$).

Para demonstrar o perfil sorológico associado ao resultado do teste molecular, os valores da relação S/CO acima de 1,2 foram distribuídos em faixas, exibindo apenas valores de S/CO das amostras positivas, visto que já foi evidenciado o resultado do teste molecular das amostras inconclusivas. Os valores da relação S/CO das amostras positivas oscilou de 1,2 a 9752,000. À vista disso, a melhor distribuição dos valores de S/CO das amostras foi em 4 faixas (agrupamentos). A Tabela 1 demonstra a taxa de amostras detectáveis e indetectáveis no NAT de acordo com os agrupamentos dos valores da relação de S/CO.

Tabela 1- Taxa de detecção de NAT HIV detectáveis e indetectáveis de acordo com os agrupamentos de valores de S/CO ARCHITECH HIV Ag/Ab

ARCHITECH HIV Ag/Ab S/Co	Nº	NAT HIV Detectável % (Nº)	NAT HIV Indetectável % (Nº)
> 1,2 e ≤ 10	205	3% (6)	97% (199)
> 10 e ≤ 60	55	64% (35)	36% (20)
> 60 e ≤ 110	18	89% (16)	11% (2)
> 110	410	97,3 % (399)	2,7% (11)
Total	688	66,38% (456)	33,62% (232)

A Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) foi utilizada para determinar o melhor ponto de corte dos valores de S/CO das 910 amostras provenientes do ensaio ARCHITECH HIV Ag/Ab. Os resultados apresentaram uma curva estatisticamente significativa (AUC [Área sob a curva] = 0,986, EP [Erro padrão] = 0,004, $p = 0,000$; 95% CI [Intervalo de confiança] = 0,978 – 0,994), demonstrando que a escolha aleatória de valores de S/CO, 98,6% das amostras NAT HIV detectável apresentarão valores de S/CO maiores que os valores de amostras NAT HIV indetectáveis (Figura 1).

Foram consideradas como verdadeiro positivo e verdadeiro negativo as amostras que resultaram como NAT detectável e indetectável, respectivamente. O ponto de corte que maximizou a sensibilidade e a especificidade foi de 15,020, com sensibilidade de 97,6% e especificidade de 95,9%. O valor preditivo positivo (VPP) foi 95,89% e o valor preditivo negativo (VPN) foi 97,55%. A acurácia do teste foi de 96,80%. O ponto de corte apresentou maior capacidade de classificar quem tinha presença de viremia RNA HIV (97,6% dos casos) quando comparado a quem não tinha viremia RNA HIV (95,9% dos casos).

Com isso, se estabeleceu a correlação entre os valores de S/CO das amostras com seus respectivos resultados do NAT (Tabela 2), onde se demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de S/CO e a presença de RNA viral na detecção do HIV no teste NAT.

DISCUSSÃO

Os métodos de triagem sorológica (Quimioluminescência – ARCHITECH HIV Ag/Ab Combo) e molecular (NAT) realizados simultaneamente na Fundação HEMOPA para a detecção do vírus HIV são imprescindíveis para garantir uma boa segurança transfusional e a diminuição de resultados inconclusivos, evitando assim a transmissão de partículas virais através da transfusão sanguínea.^(12,13) Embora haja muitos estudos que demonstrem a associação do NAT a um teste de quarta geração (Quimioluminescência e Elisa),^(6,14,15) ainda são raros os que apresentam uma correlação notória e bem estabelecida.⁽¹¹⁾

Para Jacociunas et al.,⁽¹²⁾ a qualidade do sangue oferecido pelos bancos de sangue depende da correlação

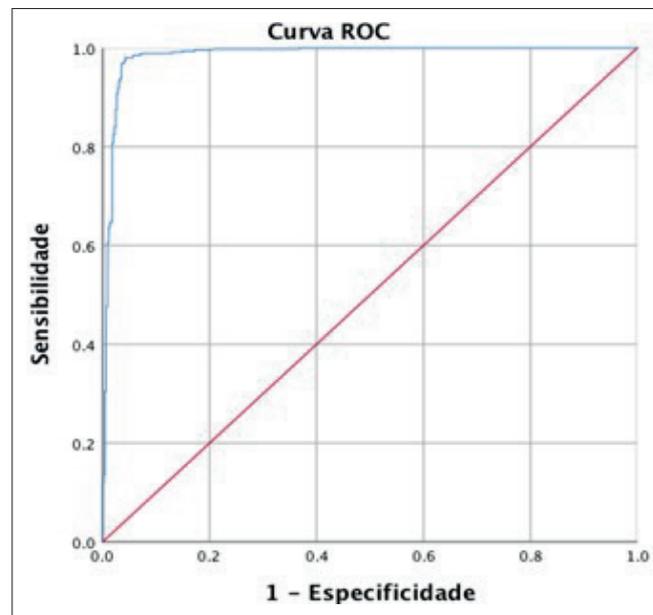


Figura 1. Curva (ROC) para os valores de S/CO das amostras reagentes na Quimioluminescência – ARCHITECH HIV Ag/Ab Combo

Tabela 2 - Correlação entre os valores S/CO de acordo com ponto de corte, e seus respectivos resultados do NAT.

ARCHITECH HIV Ag/Ab			
Ponto de corte	N°	NAT Detectável % (N°)	NAT Indetectável % (N°)
S/CO > 15,020	463	95,90% (444)	4,10% (19)
S/CO < 15,020	447	2,46% (11)	97,54% (436)
Total	910	455 (50%)	456 (50%)

Teste X² (p-valor < 0,005)

na interpretação entre os resultados de testes sorológicos (Quimioluminescência) e do NAT (NAT HIV-Bio-Manguinhos). Um estudo realizado na Índia expôs uma correlação bastante significativa entre o método de sorologia (ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo) e os resultados da metodologia NAT (*eSAS Procleix Ultrio Assay*) na triagem do HIV em relação ao vírus da Hepatite B e da Hepatite C nos anos de 2010 a 2012.⁽¹⁶⁾

No presente estudo, com quantitativo de 910 amostras reagentes (positivas e inconclusivas), foi possível notar que em 2015 o percentual de amostras foi maior (26,38%) no *Progress* em decorrência de não haver existência do sistema *SBS Web* que foi implantado a partir de julho de 2016, o que vem a justificar o percentual de amostras no mesmo sistema se apresentar alto.

Com o resultado de 910 amostras reagentes, observou-se que 222 amostras foram inconclusivas (0,8 – 1,2 S/CO), na qual 100% resultaram em NAT indetectável, corroborando com os achados de Alonso et al.,⁽¹⁷⁾ onde apresentou em sua pesquisa o total de 69.471 amostras testadas pelo ensaio ARCHITECT Ab/Ag Combo, sendo que apenas sete resultaram como inconclusivas, constatando que 100% das amostras inconclusivas obtiveram resultado negativo em dois testes confirmatórios: pelo NAT (kPCR Versant HIV-1 Plataforma de RNA) e pelo RIBA - *Recombinant Immunoblot Assay*/ Ensaio de Imunotransferência Recombinante (Geenius HIV 1/2 Teste de confirmação [Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France]).

As amostras positivas com NAT detectável (456) do presente estudo tiveram valor de S/CO acima de 1,2 pelo ARCHITECT Ab/Ag Combo, semelhantemente ao de Roy et al.⁽¹⁸⁾ e Chacón e Mateos⁽¹⁴⁾ que consideraram amostras positivas com valor de S/CO acima de 1. No segundo estudo (RIBA), Chacón e Mateos⁽¹⁴⁾ demonstraram que 96,6% de suas amostras (229) eram NAT detectável (kPCR).

Quanto à análise descritiva realizada, observou-se que o estudo de Alonso et al.,⁽¹⁷⁾ demonstrou que a mediana das amostras positivas de S/CO foi 660,74 variando de 2,91 e 1392,12 (599 amostras), e a mediana obtida por uma pesquisa executada por Roy et al.⁽¹⁸⁾ em Nova Deli foi de 405,28 variando entre 22,67 e 1639,12 (147 amostras). Em comparação ao presente estudo a mediana encontrada (503,93) se encaixa na variação de medianas identificadas por Roy et al.⁽¹⁷⁾ e Alonso et al.,⁽¹⁸⁾ respectivamente, ou seja, possibilitando demonstrar a aproximação das medianas descritas na literatura.

De acordo com a organização das amostras aos agrupamentos estabelecidos por meio dos valores de S/CO para a determinação do perfil sorológico, pode-se constatar que quanto maior o valor de S/CO, maior a possibilidade de as amostras resultarem como NAT detectável.

Entretanto, vale ressaltar que mesmo o alto percentual de detectáveis na última faixa (S/CO >110) não exclui a possibilidade de haver amostras indetectáveis (2,7%). Da

mesma forma em que ocorre nas primeiras faixas, na qual foram obtidos valores de S/CO menores, tornando maior a possibilidade de as amostras dessas faixas serem NAT indetectável (ver Tabela 1). Assim como em nosso estudo, Alonso et al.⁽¹⁷⁾ utilizaram o mesmo ensaio ARCHITECT Ag/Ab Combo, porém com a utilização de duas metodologias diferentes como teste confirmatório, sendo o RIBA utilizado como um teste confirmatório primário e o NAAT como teste confirmatório secundário. Com isso, foi possível observar que das amostras com S/CO \geq 100 (603 amostras), o NAAT apresentou-se com resultado detectável para 7 das 9 amostras que obtiveram resultados negativos inicialmente pelo RIBA, dessa forma sustentando a utilização do NAAT na triagem, como o nosso estudo demonstrou.

Após a análise da curva ROC foi determinado o ponto de corte de 15,020 que evidenciou as amostras que apresentaram presença de RNA HIV e ausência de RNA HIV. Desse modo, uma pesquisa em Madri alcançou o ponto de corte de 32,7 com a realização da curva ROC atingindo uma sensibilidade de 97,4% e especificidade de 100%,⁽¹⁴⁾ e diante disso Guarner⁽¹³⁾ sugeriu que a sensibilidade poderia estar sendo reduzida pelo fato do antígeno p24 formar uma ligação com os anticorpos que o paciente já continha.

CONCLUSÃO

No presente estudo, estabelecemos que na triagem sorológica-molecular há uma correlação estatisticamente significativa, na qual a presença de anticorpos e/ou antígenos no teste ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo orienta a predição de viremia no NAT, isto é, na maioria dos casos. Portanto, torna-se necessário o constante avanço das metodologias utilizadas na triagem dos bancos de sangue, uma vez que o HIV possui uma clínica própria, daí ser imprescindível a busca da identificação precoce de doadores que possam estar infectados ainda que não tenham conhecimento de tal infecção.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Pará e a todos os docentes do curso de Biomedicina do Centro Universitário Metropolitano da Amazônia, em especial ao nosso orientador, Dr. Carlos Eduardo de Melo Amaral.

Abstract

Objective: Search for the correlation between serological and molecular methods of HIV detection in screening blood donors at the HEMOPA Foundation. Methods: The HIV reagent samples were searched for the years 2015 to 2019 in the Blood Bank System of the HEMOPA Foundation. For statistical analysis, the SPSS program was used to compare the medians of the S / CO values with detectable and undetectable NAT. The X² test was used to point out the correlation

between S / CO values and the presence of viral RNA. Results: 910 reagent samples were obtained for the study, in which 75.60% (688/910) positive (S / CO > 1.2) and 24.40% (222/910) inconclusive (S / CO 0.8) -1.2). The median S / CO of the detectable samples was 503.93 and the undetectable was 1.22 in NAT. Conclusion: We established that in serological-molecular screening there is a statistically significant correlation, in which the presence of antibodies and / or antigens in the ARCHITECH HIV Ag / Ab Combo test guides the prediction of viremia in NAT.

Keywords

HIV; Serology; Blood Banks

REFERÊNCIAS

1. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. Brasília: Ministério da Saúde; 2018.
2. Costa LJ, Arruda LB, Mendonça LM, Lucas CGO. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida/AIDS. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2015. p. 498-531.
3. Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 5, de 28 de setembro de 2016. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo IV. Diário Oficial da União, 28 fev 2017; seção 1.
4. Vallefucio L, Mazzarella C, Portella G. Fourth generation assays for HIV testing. Expert Rev. Mol. Diagn. 2016 Mai;16(7):723-32. doi:10.1080/14737159.2016.1179115.
5. Martins TS, Nóbrega JOT. Segurança transfusão no Brasil: dos primórdios ao NAT. Rev. Bras. Anal. Clin. 2018 Nov; 50(4):321-6. doi:10.21877/2448-3877.201800693.
6. Wang L, Wang JY, Tian XD, Ruan JX, Yu Y, Yan F. Sample-to-cutoff ratios using Architect HIV Ag/Ab Combo: The influence with the results of supplemental tests and optimal cutoff value to predict HIV infection. J. Clin. Lab. Anal. 2019 Jan;33(5). doi:10.1002/jcla.22866.
7. Cui C, Liu P, Feng Z, Xin R, Yan C, Li Z. Evaluation of the clinical effectiveness of HIV antigen/antibody screening using a chemiluminescence microparticle immunoassay. J. Virol. Methods. 2015 Ago;214:33-36. doi:10.1016/j.jviromet.2014.07.026.
8. Zhao Y, Gou Y, Li D, et al. Performance evaluation of a new automated fourth-generation HIV Ag/Ab combination chemiluminescence immunoassay. Clin. Chem. Lab. Med. 2018 Abr;56(5):115-7.
9. Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.712, de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União 13 nov 2013; seção 6.
10. Souza RLC. Avaliação tecnológica do teste molecular (NAT) para HIV, HCV e HBV na triagem de sangue no Brasil. São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências] Universidade de São Paulo; 2018.
11. Jacociunas LV, Davila TF, Santos DV, Brietzke CB. Avaliação da correlação de sorologia e teste de ácido nucleico em doadores de sangue reagentes para o Vírus da Imunodeficiência Humana. Clin. Biomed. Res. 2018 Dez;38(4):332-38. doi:10.4322/2357-9730.86556
12. Mafirakureva N, Mapako T, Khoza S, Emmanuel JC, Marowa L, Mvere D, et al. Cost effectiveness of adding nucleic acid testing to hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus screening of blood donations in Zimbabwe. Transfusion. 2016 Dez ;56(12):3101-11. doi:10.1111/trf.13858.
13. Guarnier J. Human immunodeficiency virus: Diagnostic approach. Semin Diagn Pathol. 2017 Jul;34(4):318-24. doi:10.1053/j.semdp.2017.04.008.
14. Chacón L, Mateos ML, Holguín A. Relevance of Cutoff on a 4th Generation ELISA Performance in the False Positive Rate During HIV Diagnostic in a Low HIV Prevalence Setting. J Clin Virol. 2017 Jul;92:11-13. doi: 10.1016/j.jcv.2017.04.014.
15. Muthukumar A, Alatoon A, Burns S, Ashmore J, Kim A, Bannister E, et al. Comparison of 4th-Generation HIV Antigen/Antibody Combination Assay With 3rd-Generation HIV Antibody Assays for the Occurrence of False-Positive and False-Negative Results. Lab Med. 2015 Mai;46(2):84-e29. doi:10.1309/LMM3X37NSWUCMVRS.
16. Pandey P, Tiwari AK, Dara RC, Rawat GS, Negi A, Raina V. Confirmation and follow up of initial "NAT yields": Prospective study from a tertiary healthcare center in India. Transfus Apher Sci. 2016 Abr;54(2):242-247. doi:10.1016/j.transci.2015.08.003.
17. Alonso R, Pérez-García F, Gijón P, Collazos A, Bouza E. Evaluation of the Architect HIV Ag/Ab Combo Assay in a low-prevalence setting: The role of samples with a low S/CO ratio. J Clin Virol. 2018 Jun;103:43-47. doi:10.1016/j.jcv.2018.04.002.
18. Roy P, Kapoor R, Rawat P, Aggarwal M, Gaur R, Anand M, et al. Occurrence of false positivity in a fourth generation (Ag/Ab) HIV screening assay: horns of a dilemma. Int J Res Med Sci. 2018 Jul;6(7):2423-29. doi: 10.18203/2320-6012.ijrms20182829.

Correspondência

Luanne Rafaela Magalhães Cunha
 Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará
 Tv. Padre Eutíquio, 2109 - Batista Campos
 Belém - PA - CEP: 66033-000
 E-mail: luannermc@gmail.com

Incidência de *Streptococcus* β -Hemolítico em Gestantes do Município de Campinas, São Paulo

β -hemolytic Streptococcus incidence in pregnant women of Campinas Municipality, São Paulo

Melissa Miguel Fedozzi¹

Jacqueline Fátima Martins de Almeida²

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a incidência de *Streptococcus* β -hemolítico em gestantes e a suscetibilidade aos antimicrobianos das pacientes colonizadas. **Métodos:** Para isso, foram analisadas 4.380 amostras de secreções vaginais e anais de gestantes, a partir de 35 semanas de gestação, atendidas em laboratório particular na cidade de Campinas, para detecção da presença de *Streptococcus* β -hemolítico. **Resultados:** Foi encontrada uma prevalência de colonização nas gestantes analisadas de 12% (504/4380), sendo 293 (13%) vaginais e 211 (10%) anais. Das positivas, foi realizado o perfil de resistência bacteriana em 60 amostras, sendo 20% das amostras anais resistentes à clindamicina e 22% à eritromicina e das amostras vaginais 25% resistentes à clindamicina e 33% à eritromicina, não havendo resistência à penicilina e ampicilina. **Conclusão:** Diante da incidência apresentada, ressalta-se a importância da realização do rastreio da colonização transitória de estreptococos β -hemolíticos em gestantes durante o pré-natal, associado à adequada profilaxia intraparto, para minimizar os riscos de ocorrência de sepse nos neonatos.

Palavras-chave

Infecção por *Streptococcus agalactiae*; Sepse Neonatal; Recém-Nascido; Gestantes

INTRODUÇÃO

As bactérias são classificadas, primeiramente, de acordo com sua morfologia, para só depois serem diferenciadas de acordo com a coloração e resposta às provas bioquímicas.⁽¹⁾

A classificação morfológica é dividida em cocos, bacilos e espirilos. Embora as bactérias tenham semelhanças estruturais, as mesmas possuem diferenças em sua composição e no seu tratamento diante de uma patologia. A principal ferramenta utilizada para diferenciação de bactérias é a técnica de coloração de Gram. A técnica permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: Gram-negativas e Gram-positivas.⁽²⁾

A coloração de Gram sozinha não permite a total diferenciação e identificação das bactérias. Para isto, é necessário realizar as provas bioquímicas específicas para cada grupo de bactérias, como por exemplo: EPM, MILI, citrato, DNase, coagulase, catalase, oxidase, entre outras.^(1,3)

Os *Staphylococcus* e os *Streptococcus* são bactérias Gram-positivas que estão entre os microrganismos mais isolados em amostras biológicas. Os *Staphylococcus* são geralmente encontrados na pele e mucosa. As espécies mais importantes podem ser identificadas com algumas provas específicas, sendo a habilidade de coagular o plasma o teste mais aceito para identificar *Staphylococcus* patogênicos associados com infecções agudas.^(4,5)

Os *Streptococcus* são capazes de causar diversas doenças nos seres humanos, entre as mais frequentes estão as infecções do trato respiratório, pele, tecidos moles, endocardites, sepse e meningites. Entre os sistemas de nomenclaturas desenvolvidas para a identificação de *Streptococcus*, destacam-se aquelas baseadas nas características hemolíticas, que colocadas em meios de cultura ágar sangue de carneiro a 5%, observa-se o tipo de hemólise.^(4,5)

Existem três classificações de hemólise baseadas no halo de hemólise causado pela bactéria: a α -hemólise é caracterizada como uma hemólise parcial, ocorrendo uma

¹ Biomédica, habilitada em análises clínicas, especialista em microbiologia avançada. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

² Biomédica habilitada em biologia molecular e doutora em Ciências Médicas pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, Brasil.

Recebido em 12/11/2020

Aprovado em 09/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102083

zona cinza esverdeada; a β -hemólise é caracterizada pela lise completa das hemácias, ocorrendo uma zona transparente ao redor da colônia, e a γ -hemólise é caracterizada pela ausência de hemólise.⁽³⁾

O teste de catalase é utilizado para diferenciar os *Staphylococcus* (catalase positiva) dos *Streptococcus* (catalase negativa). Entretanto, existem relatos na literatura de *Streptococcus aureus* catalase negativa relacionados a processos infecciosos, embora raros, descritos em vários países, inclusive o Brasil. A catalase constitui um mecanismo de defesa para a bactéria contra células fagocitárias, porém não é um fator essencial para a sobrevivência do *S. aureus*.⁽⁶⁾

Dentro deste enorme grupo, o *Streptococcus agalactiae*, também conhecido como *Streptococcus* β -hemolítico ou *Streptococcus* do Grupo B (SGB), tornou-se o agente bacteriano de maior frequência e maior importância clínica para as infecções perinatais e neonatais.^(4,7)

Trata-se de um coco Gram-positivo disposto em cadeias que se agrupa em colônias lineares em pares com tamanhos variáveis. São anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativa. São imóveis e possuem parede celular grossa constituída por peptidoglicano, carboidratos, proteínas, ácido teicoico e membrana simples.⁽⁸⁾

Os *Streptococcus agalactiae* cresce em meio nutricionalmente enriquecido em ágar sangue. Suas colônias são pequenas, de cor alaranjada ou vermelho-tijolo, e ela apresenta característica hidrolítica formando uma zona de β -hemólise.⁽⁹⁾

A principal característica do *S. agalactiae* é a presença do antígeno do grupo B, polissacarídeo da parede celular. Em 1933, Lancefield desenvolveu uma classificação para os *Streptococcus* baseada nas características antigênicas de um carboidrato de parede celular denominado de carboidrato C. Em 1934, Lancefield diferenciou o *Streptococcus* hemolítico bovino, classificando-o como pertencente ao grupo B. Em 1937, Sherman classificou os *Streptococcus* em quatro grupos: pirogênicos, viridans, láctico e *enterococcus*, sendo que o *agalactiae* ficou no grupo B dos pirogênicos.⁽¹⁰⁾

As cepas da bactéria podem ser caracterizadas com base em três marcadores sorológicos:⁽¹⁾ Antígeno polissacarídeo: grupo específico de parede celular ou antígeno de grupo β (antígeno da classificação de Lancefield) composto por ramnose, N-acetilglicosamina e galactose; Nove polissacarídeos capsuladores tipo-específico (Ia, Ia/c e II a VIII), que caracterizam nove tipos sorológicos da bactéria. Os sorotipos mais comumente associados às patologias são Ia, Ib, II, III e V; Proteínas de superfície: carboidrato C.⁽¹⁾

A carência de anticorpos contra alguns antígenos tipo-específicos é um fator fundamental para o desenvolvimento de doenças produzidas por sorotipagens do grupo B. As cepas do tipo III de *Streptococcus* do grupo B apresentam 60% das bactérias isoladas em casos de septicemia neonatal e mais de 80% dos isolados provenientes de casos

latentes com meningite, sugerindo que esse sorotipo de *Streptococcus* do grupo B possui maior virulência.⁽¹¹⁾

Dentre as inúmeras bactérias que compõem a microbiota humana, o *Streptococcus agalactiae* pode fazer parte dela. O microrganismo é encontrado como saprófita vaginal em mulheres e está presente no trato gastrointestinal e geniturinário, podendo ser transitório, crônico ou intermitente. As gestantes colonizadas são geralmente assintomáticas, no entanto durante a gravidez e no puerpério o SGB pode causar infecção do trato urinário, sendo responsável por 2% a 4% das infecções, podendo causar parto prematuro, infecção do líquido amniótico e infecção do útero após o parto.⁽¹²⁾

Comumente gestantes são acometidas por infecções deste gênero de bactérias devido às alterações fisiológicas que ocorrem no período de gestação alterando sua resposta a infecções e limitando o tratamento antibioticoterápico, uma vez que a ação de antibióticos em fetos ainda não é bem conhecida.⁽¹³⁾

Segundo o CDC (sigla do inglês: *Centers for Disease Control and Prevention*), a transmissão ao feto ocorre quando as membranas da placenta se rompem e o SGB ascende da vagina para o líquido amniótico. Há evidências de que ele também pode ultrapassar barreiras intactas. Quando atinge o líquido amniótico, a bactéria pode ser aspirada para os pulmões fetais levando à bacteremia.⁽¹⁴⁾

Outra via de transmissão principal para o neonato é a transmissão vertical, onde o recém-nascido entra em contato com a flora vaginal e conseqüentemente com o *Streptococcus agalactiae*.⁽⁵⁾

O SGB é responsável por cerca de 25% das mortes de neonatos em decorrência de pneumonia, meningite ou septicemia. Nos recém-nascidos a infecção pode se apresentar de duas formas:⁽¹⁴⁾ início precoce, que pode ocorrer durante a primeira semana de vida devido à transmissão vertical, causando mais frequentemente sepse, meningite e pneumonia; início tardio, que pode ocorrer da primeira semana até o terceiro mês de vida devido à transmissão vertical, que ocorre raramente, e por fim a transmissão por outras fontes externas desconhecidas, causando mais frequentemente meningite.⁽¹⁴⁾

Em 2010, um guia foi elaborado pela American Academy of Pediatrics recomendando a prescrição de quimioprofilaxia em duas situações:⁽¹⁴⁾ Em todas as gestantes colonizadas (SGB), de acordo com o resultado da cultura realizada no final da gestação a partir das 35 semanas; e nas gestantes que não tenham sido submetidas à pesquisa da colonização pelo SGB com o tempo de ruptura de membrana maior que 18 horas, temperatura igual ou superior a 38°C durante o parto e/ou prematuridade.⁽¹⁴⁾

O tratamento e profilaxia são realizados com a utilização de antibióticos de amplo espectro, mais especificamente a penicilina e ampicilina. Para casos em que há sensibilidade

a algum destes antibióticos utilizados são cefazolina, clindamicina, eritromicina e vancomicina.⁽¹³⁾

A administração das doses adequadas e do tipo de profilaxia e/ou tratamento segue o protocolo de Prevenção da Doença Estreptocócica Perinatal do Grupo B elaborada pelo CDC e também pela conduta médica aplicada a cada caso e a cada paciente.⁽¹²⁾

O uso de antibióticos para tratamento destes casos aumenta a preocupação com casos de resistência bacteriana. Casos já foram relatados de resistência à penicilina e ampicilina. O CDC também relata casos de resistência à clindamicina e eritromicina, que são antibióticos alternativos à penicilina e ampicilina.⁽¹⁵⁾

Portanto, a realização do antibiograma no momento do diagnóstico da infecção é de suma importância clínica. Através dele é possível analisar a sensibilização do *Streptococcus agalactiae* frente a gama de antibióticos disponíveis e escolher o mais adequado ao tratamento.⁽¹⁶⁾

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência da colonização por *Streptococcus* β -hemolítico em gestantes do município de Campinas–SP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional, transversal e retrospectivo em um laboratório de patologia clínica particular do município de Campinas–SP, onde foram realizadas análises dos resultados dos exames laboratoriais de mulheres grávidas com idade gestacional a partir de 35 semanas submetidas à pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.

Na rotina laboratorial, as amostras de secreção vaginal e anal das pacientes submetidas a este exame foram coletadas com *swab* estéril em meio de transporte Stuart. As amostras obtidas foram inoculadas em meio seletivo de caldo Toddy Hewitt e incubadas 24 horas a 37°C. A seletividade desse meio se dá mediante a inclusão de gentamicina e ácido nalidíxico, o que permite o crescimento de SGB, inibindo a proliferação de contaminantes.⁽¹⁰⁾ Após esse tempo de incubação, as amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5%, sendo então incubado por mais 24 horas a 37°C.

As colônias sugestivas de SGB, seja por sua morfologia e tipo de hemólise, foram submetidas ao teste de Fator CAMP, que consiste em avaliar a produção de um fator extracelular de hemólise, produzido pelo SGB, intensificando a hemólise de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 produtores de β -lisina em ágar sangue. Foi realizada uma estria de *Streptococcus* a ser identificado perpendicularmente à estria de *Staphylococcus*, sem se tocarem, após a incubação por 24 horas a 37°C. O fator CAMP positivo forma uma ponta de flecha, na interseção das duas estrias e a amostra então é considerada positiva indicando o *Streptococcus agalactiae*.^(6,14,17)

As amostras confirmadas pelo fator CAMP foram colocadas para a identificação em equipamento de automação em microbiologia (BD Phoenix 100, Franklin Lakes, EUA), onde é utilizado o painel PMIC/ID 105 para cocos Gram-positivos. Muitos dos testes presentes no painel são métodos clássicos: testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, tais como: cromogênicos e flurogênicos, bem como substratos que são fontes única de carbono.⁽¹⁷⁾

Após a identificação do *Streptococcus agalactiae*, foram avaliadas a suscetibilidade antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar conforme recomendações do *Clinical Laboratory Standart Institute*.⁽¹⁴⁻¹⁸⁾

Foi realizada uma suspensão com solução salina estéril (NaCl 0,9%) com turvação de 0,5 da escala de McFarland. A suspensão foi semeada uniformemente em placa de Ágar Mueller-Hinton sangue com o auxílio de um *swab* estéril e em seguida foram colocados discos de papel impregnados com antibióticos sobre o meio. Os antibióticos testados foram: ampicilina, penicilina, clindamicina e eritromicina.

As placas semeadas foram incubadas 24 horas a 37°C. As escolhas dos antibióticos ficam a critério da interpretação sugerida à norma M2-A8 adotada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.^(14,17)

As leituras dos halos de inibição e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com a CLSI.⁽¹⁸⁾ Foram considerados “sensíveis” os seguintes diâmetros dos halos: ampicilina (≥ 24 mm); clindamicina (≥ 19 mm); eritromicina (≥ 21 mm); penicilina (≥ 24 mm).⁽¹⁸⁾

Os dados coletados foram tabulados em planilha Microsoft Office Excel, versão 2017, e foram comparados dados como: idade das gestantes, quantidade de exames positivos e negativos, diferenciação entre anais e vaginais e as respectivas porcentagens de positivos e negativos.

ÉTICA

Todos os procedimentos seguidos nos experimentos deste trabalho estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional [Resolução CNS 466/2012] e internacional [Declaração de Helsinkil/ *World Medical Association*], tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista – UNIP sob Parecer nº 2.666.377.

RESULTADOS

No estudo realizado em um laboratório de patologia clínica particular do município de Campinas–SP, foram analisadas 4.380 amostras de gestantes a partir de 35 semanas de gestação. Dentre elas, 504 (12%) amostras tiveram culturas positivas e 3.876 (88%) resultaram em cultura negativa para SGB na análise do material anal e vaginal.

Dentre as pacientes testadas para SGB, a faixa etária variou de 19 a 47 anos, com média de 33±5 anos de idade.

Houve uma maior incidência na faixa etária de 31 a 40 anos com 348 (69%) mulheres positivas para a infecção por SGB, seguida de 116 (23%) mulheres de 21 a 30 anos, 30 (6%) mulheres entre 41 a 50 anos e ainda 10 (2%) mulheres até 20 anos.

Dentre as 504 gestantes colonizadas, 293 (13%) amostras foram positivas na colonização vaginal, 211 (10%) na colonização anal (Figura 1).

Das 60 amostras submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana, 12 (20%) das amostras anais mostraram-se resistentes à clindamicina e 13 (22%) à eritromicina, e das amostras vaginais 15 (25%) resistentes à clindamicina e 20 (33%) à eritromicina. Não houve resistência aos antibióticos penicilina e ampicilina em nenhuma das amostras (Figura 2).

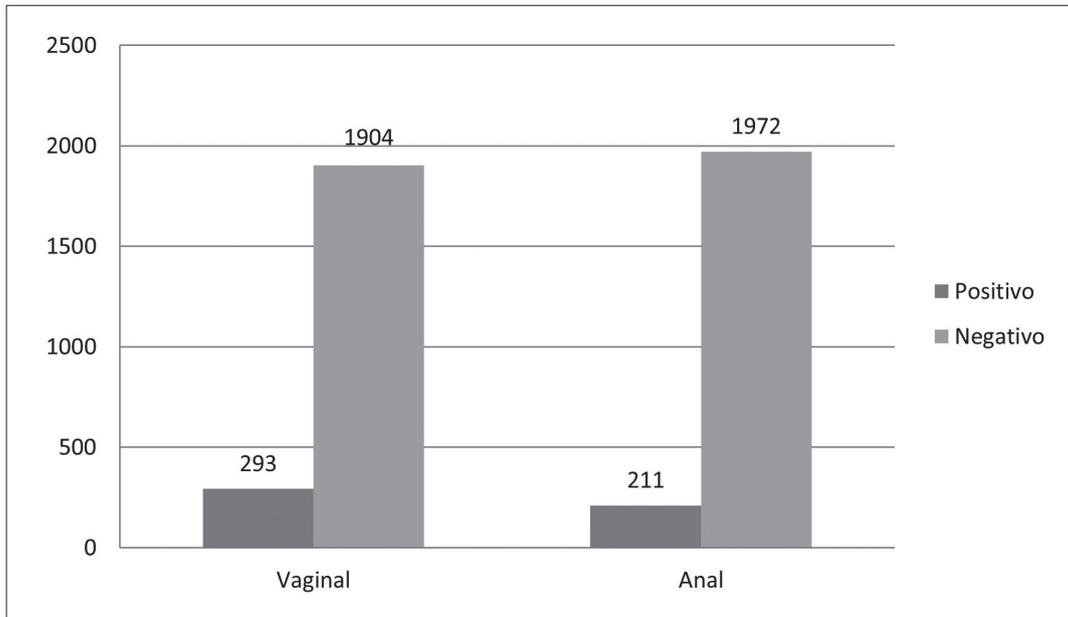


Figura 1. Incidência de SGB nas diferentes amostras de secreção vaginal e anal. Relação de resultados positivos e negativos por amostra coletada.

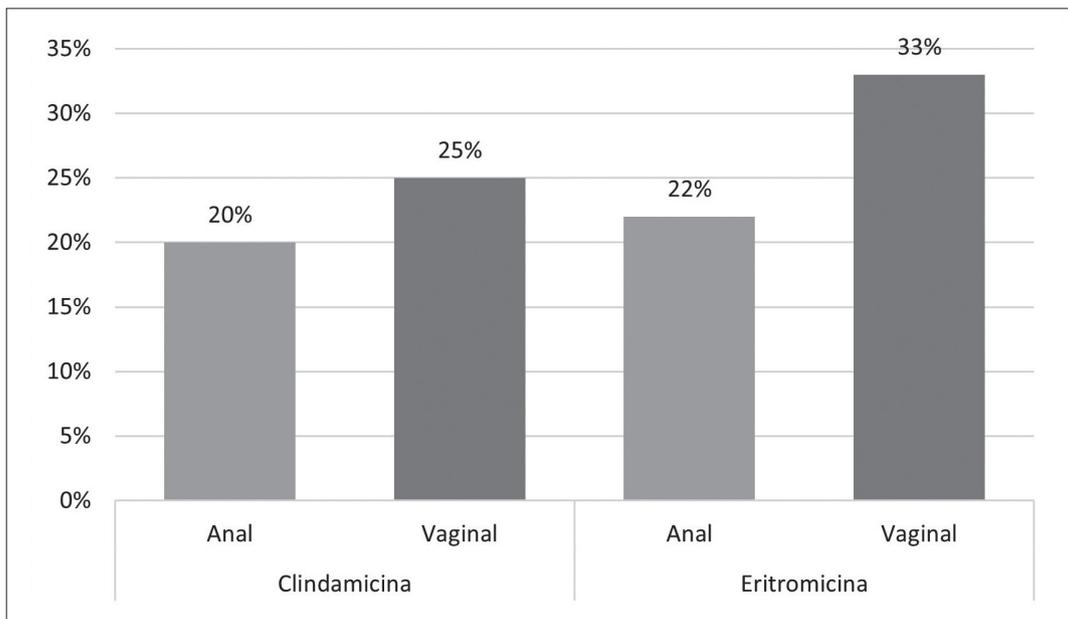


Figura 2. Resistência bacteriana do SGB aos antibióticos testados. Descrição do padrão de resistência antimicrobiano por tipo de amostra analisada.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi detectada a colonização materna pelo *Streptococcus* β -hemolítico em 12% das amostras analisadas. O percentual de colonização observado foi proporcional com o apresentado na literatura, sendo que a média internacional se encontra em torno de 10% a 30% das grávidas colonizadas com SGB.^(12,14,19,20) No Brasil, os dados sobre a colonização são semelhantes, com taxas de 11,1% no Rio Grande do Sul, 20% na Região Nordeste do país e 25,4% em São Paulo.^(12,19-21) Sendo que a prevalência média brasileira de colonização por SGB tem se mostrado menor do que países asiáticos como a China, que possui prevalência entre 3,7% a 14,5% da população.⁽²²⁾

Diante dos artigos avaliados, muitos autores consideram que a cultura bacteriana é o padrão-ouro para a detecção do *Streptococcus* β -hemolítico, quando se utiliza material obtido de coleta vaginal e anal, semeados em meios de cultura específicos, aumentando assim a possibilidade de identificação.⁽²³⁾ Porém, os dados sobre a colonização pelo *Streptococcus* β -hemolíticos são por muitas vezes escassos, podendo apresentar variações como a idade materna, o tempo de gestação no momento em que as coletas são realizadas, o local da coleta, os métodos utilizados e a origem; as características das populações estudadas e fatores de riscos.^(14,24)

Apesar de fazer parte das diretrizes da Sociedade Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, este exame nem sempre é realizado por todas as gestantes, por diversos fatores.⁽¹²⁾ Quando a cultura de SGB não é realizada ou é desconhecida, recomenda-se o uso de antibióticos profiláticos, nas seguintes situações: trabalho de parto com menos de 37 semanas de gestação, rotura das membranas ovulares a 18 horas ou mais, temperatura materna intraparto maior ou igual a 38°C. Nesses casos o uso da profilaxia intraparto com drogas antimicrobianas tem-se mostrado efetivo como estratégia para a prevenção da transmissão vertical.⁽¹⁴⁾

Das 60 amostras que foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos em nosso estudo, 55% apresentaram resistência à eritromicina e 45% à clindamicina, demonstrando uma tendência no aumento de amostras de SGB resistentes a esses antimicrobianos em questão comparados em estudos realizados em diferentes países.

Assim, com relação à eritromicina os maiores índices de resistência foram detectados nos Estados Unidos da América (30%)⁽²⁵⁾ e na França (21,4%).⁽²⁶⁾ Com relação à clindamicina, as taxas de resistência são inferiores, com índices de 11,4% nos Estados Unidos da América e 17,5% na França. Nenhuma das nossas amostras apresentaram resistência à penicilina e à ampicilina, pois de fato não há relato na literatura, até o presente momento, sobre a resistência desses antibióticos na população brasileira. No entanto, há indícios relatados na África, apresentando de

23,8% a 33,6% de resistência à penicilina e à ampicilina, respectivamente.^(27,28)

Sendo assim, atualmente a penicilina continua sendo a droga de escolha como profilaxia antimicrobiana intraparto, por ser uma droga de baixo custo e de largo espectro de ação direcionado para os cocos Gram-positivos, sendo assim, eficaz na passagem da barreira transplacentária. Nos casos de alergia à penicilina, o CDC recomenda o uso de clindamicina, desde que esta não apresente resistência induzível nos casos de cepas resistentes à eritromicina.^(14,29) Em situações de resistência às drogas citadas anteriormente, existem outras drogas que podem ser administradas, como a cefazolina e a vancomicina, sendo essa droga de última escolha.

A infecção por SGB continua sendo uma importante causa de morbimortalidade em recém-nascidos. As síndromes clínicas mais comuns ocorrem no início precoce, sendo essas a septicemia e a pneumonia; a infecção no início tardio apresenta na maioria dos casos meningite, podendo causar sequelas permanentes.^(11,29) Aproximadamente 25% de casos de septicemia em recém-nascidos no início precoce ocorrem em prematuros com um potencial de letalidade de cerca de 20%. Já para os bebês nascidos de gestação a termo essa taxa cai para 2.1%.^(29,30)

As gestantes colonizadas são geralmente assintomáticas, e por este motivo o rastreamento universal das gestantes entre 35 a 37 semanas de gestação e a prática de profilaxia intraparto para aquelas colonizadas tem tido uma redução dos casos de sepse neonatal.^(23,29,30)

CONCLUSÃO

Conclui-se que o *Streptococcus* β -hemolítico é prevalente nas gestantes do município de Campinas-SP com taxa de incidência semelhante ao restante do Brasil.

Ressalta-se a importância da classe médica da realização da cultura para rastreio e pesquisa de colonização por *Streptococcus* β -hemolítico no acompanhamento pré-natal de gestantes, com avaliação sistemática da suscetibilidade aos antimicrobianos para a escolha da quimioprofilaxia adequada, garantindo assim a segurança do recém-nascido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à equipe de gestores do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Franceschi, que contribuiu para a realização deste trabalho.

Abstract

Objective: The aim of this study was evaluate the incidence of β -hemolytic Streptococcus in pregnant women and antimicrobial susceptibility of colonized patients. Methods: For this, a cohort of 4,380 of pregnant women, from 35 weeks of gestation, were analyzed, samples of vaginal and anal secretion were collected in a private laboratory in

the city of Campinas. Result: The prevalence of colonization was of 12% (504/4380) in pregnant women was evidenced, being 293 (13%) vaginal and 211 (10%) anal. From the positives, the bacterial resistance profile was performed in 60 samples, 20% of the clinical samples resistant to Clindamycin and 22% of Erythromycin and 25% of the vaginal samples resistant to Clindamycin and 33% to Erythromycin, without resistance to Penicillin and Ampicillin. Conclusion: We conclude that the emphasize the importance of performing the screening of β-hemolytic *Streptococcus* in pregnant women during the prenatal period, associated with adequate intrapartum prophylaxis is needed.

Keywords

Streptococcus agalactiae infection; Neonatal Sepsis; Pregnant women; Recent born

REFERÊNCIAS

- Murray P, Rosenthal K, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- Ferraz AR, Jorge RA. Arq. Med. 2008;22(2-3):91-100.
- Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- Chen SL. Genomic Insights Into the Distribution and Evolution of Group B *Streptococcus*. Front Microbiol. 2019 Jun 28;10:1447. doi: 10.3389/fmicb.2019.01447.
- Furfaro LL, Chang BJ, Kahler CM, Payne MS. Genomic characterisation of perinatal Western Australian *Streptococcus agalactiae* isolates. PLoS One. 2019 Oct 2;14(10):e0223256. doi: 10.1371/journal.pone.0223256.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos [Normatização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária]. Brasília: Anvisa, 2013[acesso em 30 de março 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/>
- Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2):1-21 doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018.
- Ruoff KL, Whiley A, Beighton D. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology. 8. ed. Washington, DC, 2003.
- Barbosa TDF, De Freitas LL, Souto RCF. Doença neonatal associada ao estreptococo do grupo B. RSC [periódicos na Internet]. 2017 set [acesso em 31 de mar 2021];13(4). Disponível em: <https://periodicos2.uesb.br/index.php/rsc/article/view/3618>
- Lancefield RC. Uma diferenciação sorológica de humanos e outros grupos de estreptococos hemolíticos. J Med Exp. 1933, 57(4): 571-595.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Junior WC, et al. Diagnóstico Microbiológico—Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI. 2001, p. 141-147.
- Andrade KL. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008, 30(6): 274-80.
- Furfaro LL, Chang BJ, Payne MS. Applications for Bacteriophage Therapy during Pregnancy and the Perinatal Period. Front Microbiol. 2018 Jan 8;2660. doi: 10.3389/fmicb.2017.02660.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Member of Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, 2010. Recommendations and Reports [periódicos na Internet]. 2010 nov [acesso em 31 de mar 2021];59(RR10):1-32. Disponível em <<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs08.html>>
- Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Relatório de Vigilância Nuclear Bacteriana Ativa, Rede de Programas de Infecções Emergentes, *Streptococcus* do Grupo B, 2008. [Internet] 2012 mar [acesso em 31 de mar 2021] Atlanta, GA: Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, CDC. Disponível em <<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs08.html>>
- Borger IL, d'Oliveira REC, Castro ACD, Mondino SSB. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005; 27(10): 575-579.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013, 149p., 9 volumes.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, 3tr. ed., CLSI document M45-A3 [Internet] 2016 aug [acesso em 31 de mar 2021]. Disponível em: <https://clsi.org/media/1450/m45ed3_sample.pdf>
- Veit A, Roehrs M, Mayer L, Santos S, Martini R, Tizotti M, et al. Colonization prevalence and susceptibility of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women at HUSM. Saúde (Santa Maria). 2010; 36(1): 9-14.
- Marconi C, Rocchetti TT, Rall VLM, Carvalho LR, Borges VTM, Silva MG. Detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study. São Paulo. Med. J. 2010; 128(2): 60-62.
- Szyliit NA, Malburg FL, Piccinato CA, Ferreira LAP, Podgaec S, Zlotnik E. Prevalence of rectovaginal colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women seen at prenatal care program of a health organization. Einstein (São Paulo). 2020; 18:1-6. DOI: 10.31744/einstein_journal/2020AO4920. Epub Dec 09, 2019.
- Huang J, Lin XZ, Zhu Y, Chen C. Epidemiology of group B streptococcal infection in pregnant women and diseased infants in mainland China. Pediatr Neonatol. 2019 Oct;60(5):487-495. doi: 10.1016/j.pedneo.2019.07.001. Epub 2019 Jul 26.
- Elbeitune P, Duart G, Maffei CML. Colonization by *Streptococcus agalactiae* during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. J Infect Dis. 2005; 9(3): 276-282.
- Pogere A, Zoccoli CM, Tobouti NR, Freitas PF, d'Acampora AJ, Zunino JN. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em um ambulatório de pré-natal. Ver Bras Ginecol Obstet. 2005; 27(4):174-80.
- Biedenbsch DJ, Stephen JM, Jones RN. Antimicrobial susceptibility profile among beta-hemolytic *Streptococcus* spp. Collected in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program-North America, 2001. Diag Microbiol Infect Dis. 2003; 46(4): 291-294.
- De Mouy D, Cavallo JD, Leclercq R, Fabre R; AFICORPI-BIO Network. Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(8): 2400-2402.
- Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. Obst & Gynec. 2000; 96(4): 498-503.
- Gizachew M, Tiruneh M, Moges F, Tessema B. *Streptococcus agalactiae* maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: a meta-analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019 Mar 28;18(1):14. doi: 10.1186/s12941-019-0313-1.
- Puopolo KM, Lynfield R, Cummings JJ. AAP Committee On Fetus And Newborn, AAP Committee On Infectious Diseases. Management of Infants at Risk for Group B Streptococcal Disease. Pediatrics. 2019;144(2):e20191881. DOI: 10.1542/peds.2019-1881

30. Nomura ML, Passini JR, Oliveira UM, Calil R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2009 Aug, 31(8):397-403. DOI: 10.1590/S0100-72032009000800005.

Correspondência

Jacqueline Fátima Martins de Almeida

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Rua Comendador Enzo Ferrari, Campinas - SP; CEP: 13045-770

E-mail: jacqueline_fm Almeida@yahoo.com.br

Avaliação da qualidade na gestão de estoque em laboratório clínico no município de Fortaleza, Ceará

Quality assessment in stock management in a clinical laboratory in Fortaleza Municipality, Ceará

Charles Ielpo Mourão¹

Antonia Fatima Pinheiro Ielpo²

Resumo

Objetivo: Este trabalho visa discutir sobre a correta gestão de insumos em um laboratório de análises clínicas. Nesse tipo de atividade, o Sistema de Gestão da Qualidade embasa uma série de processos visando garantir a fidedignidade dos resultados, pautados em processos bem estabelecidos. A gestão de insumos e estoque é uma atividade integrada entre os diversos setores existentes na empresa, fundamental para a garantia da qualidade do exame. Dessa forma, falhas na política de qualidade podem desencadear prejuízos materiais, institucionais e humanos. **Métodos:** Para tanto, realizou-se análise em um laboratório clínico privado de Fortaleza, Ceará, de modo observacional, prospectivo e descritivo, desenvolvido como estudo de caso. **Resultados:** Verificou-se que, apesar de sistemas de gestão de estoque serem adotados, não há treinamento efetivo e documentação detalhada que norteie todos os processos do setor. **Conclusão:** A ausência de processos bem definidos de gestão de estoque pode ser interferente importante na correta liberação dos laudos de exames, gerando prejuízos importantes à organização e ao cliente.

Palavras-chave

Gestão da Qualidade; Estoque Estratégico; Laboratório

INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade vem evoluindo ao longo do tempo, passando de um foco meramente inspeccional e estatístico ao papel de garantir a eficácia de um determinado processo. Na atualidade, possuir uma política de controle de qualidade significa estar apto a concorrer em um mercado cada vez mais exigente e que visa satisfazer tanto as necessidades do cliente quanto do mercado. Apesar das inúmeras definições do termo “qualidade”, o foco central é sempre um bom processo.⁽¹⁾

Já a garantia da qualidade está baseada em planejar, sistematizar e avaliar processos, embasada por uma documentação escrita de fácil compreensão e possibilidade de análise crítica.⁽²⁾ Isso significa que, se há um processo realizado por uma empresa, deve haver um documento escrito para realizá-lo, de fácil entendimento e passível de ser compreendido por pessoas de diferentes níveis de conhecimento, gerando indicadores para análise de modo real e crítico.

Em geral, a rotina de um laboratório de análises clínicas é bastante complexa, devido à diversidade de amostras biológicas que são coletadas, recebidas e processadas, bem como pelas diferentes metodologias empregadas para realização dos diferentes exames disponíveis. Apesar de tal complexidade, a operação da grande maioria dos laboratórios clínicos no país pode ser dividida em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica.^(3,4)

Em todas as fases, a gestão de insumos se faz presente e é extremamente importante para garantir o funcionamento do laboratório e a realização de todas as etapas dos exames. Para ilustrar essa importância, imaginemos que falte papel durante 24 horas úteis. Assim, o cadastro da solicitação do paciente será afetado, bem como o processo de coleta do material biológico, passando pela falta de impressão dos mapas de trabalho (espécie de ficha interna na qual há os dados dos pacientes, exames a realizar e resultados analíticos), planilhas de controles de qualidade internos e externos e até os laudos, que são o produto final de toda a cadeia laboratorial.

¹ Professor de Ensino Superior - Universidade Federal do Ceará.

² Especialista em Análises Clínicas e Gestão da Qualidade Laboratorial - Universidade Estadual do Ceará.

Instituição: Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, CE, Brasil.

Recebido em 03/06/2020

Aprovado em 12/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.202202001

De acordo com Chaves,⁽⁵⁾ as diversas variáveis analíticas dos exames laboratoriais precisam ser controladas ao máximo, visando garantir que os resultados sejam precisos, confiáveis e reproduzíveis. Excetuando-se a análise técnica das amostras biológicas propriamente ditas, algumas outras variáveis importantes devem ser monitoradas, como a eficiência dos insumos e reagentes, equipamentos e dispositivos de medição.⁽⁶⁾

A gestão de insumos e estoque em laboratórios de análises clínicas é uma atividade integrada entre os diversos setores existentes na empresa, porém conduzida pelos setores de almoxarifado, compras e expedição. No contexto industrial, a gestão de estoque visa gerenciar os recursos materiais que podem ajudar uma organização a gerar receita no futuro.⁽⁷⁾

Já no contexto de um laboratório de análises clínicas, a gestão de insumos e estoque visa assegurar que reagentes e insumos serão mantidos de maneira adequada, rastreável e segura para a realização de exames confiáveis, além de garantir resultados financeiros positivos para a empresa. Logo, o estoque deve existir como um regulador do fluxo de materiais, garantindo que todos os insumos relacionados à atividade do laboratório estejam disponíveis e em condições de uso sempre que houver demanda dos setores.^(6; 7)

Em termos de gestão de produção, de acordo com Ballou⁽⁸⁾, estoques são pilhas de matérias-primas, insumos, componentes, produtos em processo e produtos acabados que aparecem em numerosos pontos por todos os canais logísticos e de produção da empresa. Outra definição dada por Martins e Campos Alt⁽⁹⁾ traz que estoque é o acúmulo armazenado de recursos materiais em um sistema de produção e/ou operações. Logo, o estoque não se constitui apenas nos produtos que estão armazenados nos depósitos, mas também deve-se levar em consideração os produtos que estão relacionados às diversas atividades do laboratório executadas cotidianamente.⁽⁷⁾

O gerenciamento do estoque nasce da necessidade de se controlar todos os insumos e reagentes que entram no laboratório por meio da aquisição de produtos de diferentes segmentos, bem como tudo aquilo que é demandado para o cumprimento de todos os processos existentes realizados pelos diferentes setores, seja recepção, área técnica, depósito de material de limpeza (DML) ou expurgo.

Logo, gerenciar corretamente um estoque é garantir que as políticas de aquisição da empresa serão seguidas e

cumpridas, possibilitando a geração de receitas e mantendo uma cadeia de valor produtiva e rastreável.⁽⁸⁾

Em laboratórios de análises clínicas, frequentemente os insumos consumidos possuem um valor financeiro considerado alto, devido às características da operação. Comumente, um determinado produto voltado para a análise biológica de uma amostra pode custar várias centenas ou até milhares de reais. A Tabela 1 traz os valores médios dos insumos necessários para a realização de exames hormonais produzidos por uma multinacional produtora de insumos laboratoriais. Por questões éticas e contratuais, o nome do fornecedor foi omitido das informações.

Todos os laboratórios devem ter um almoxarifado que realize um controle dos seus produtos, de modo a garantir uma correta administração dos seus estoques. Tudo o que entra e sai do estoque deve ser documentado e devidamente sinalizado, visando minimizar perdas e maximizar o fluxo de insumos e reagentes. Dessa forma, uma gestão de estoque bem realizada deve permitir ao gestor ter a informação exata de quantos produtos há na sua organização como um todo, suas características, apresentações, validades e fontes de demanda.⁽¹⁰⁾

Slack et al.⁽¹¹⁾ definem política de estoque como o conjunto de atos diretivos que estabelecem de modo global e específico princípios, diretrizes e normas relacionadas ao gerenciamento dos produtos de uma organização. Logo, deve ser uma preocupação de qualquer empresa garantir o equilíbrio entre os custos de aquisição, estocagem, distribuição de insumos dentro dos seus diferentes setores. Ou seja, gerenciar corretamente um estoque nada mais é do que controlar a compra, distribuição e uso dos materiais dentro de uma empresa, objetivando equilibrar estoque e consumo.

A gestão de estoque é considerada como de extrema importância para a redução e controle dos custos totais, bem como para a melhoria dos processos de uma organização, atuando na parte operacional e financeira de modo conjunto, merecendo cuidados específicos e detalhados.⁽¹²⁾

Atualmente, não há uma legislação específica que regule os estoques em laboratórios de análises clínicas. Todo o direcionamento para a gestão de estoques e insumos é dado pelas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela RDC nº 302. Entretanto, o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) apresenta um capítulo que trata especificamente da Gestão de Equipamentos e Insumos. No item 7.1 da referida norma,

Tabela 1 – Preço médio de insumos laboratoriais vendidos por uma multinacional do ramo de diagnóstico *in vitro*

KIT/ANALITO	Apresentação (testes)	Valor Unitário	Valor total do KIT
Vitamina D 25-OH 3ª Geração	100	R\$ 21,90	R\$ 2.190,00
TSH Ultrassensível 2ª Geração	200	R\$ 4,51	R\$ 902,00
PTH - Paratormônio fração 1-84	200	R\$ 32,06	R\$ 6.412,00

versão 2016, há a exigência de que os laboratórios clínicos devem estabelecer processos para garantir o fornecimento e disponibilidade de suprimentos e insumos de forma a manter a execução ininterrupta de suas atividades, bem como deve haver um plano de contingência bem estabelecido para situações excepcionais que envolvam falta de reagentes ou insumos para a realização dos exames.⁽¹³⁾

Além disso, a mesma norma traz no seu item 7.2 que o laboratório deve implantar um sistema de controle de estoque visando garantir a inspeção inicial e registro das condições de recebimento dos insumos, bem como a rastreabilidade dos dados referentes ao uso, lote, validade, armazenamento e destinação dos mesmos.⁽¹³⁾

Os reagentes e suprimentos devem ser sempre armazenados de acordo com as especificações do fabricante. Além disso, a aquisição de insumos somente deve ser feita após uma análise e qualificação do fornecedor, incluindo os registros na ANVISA e demais órgãos competentes. Equipamentos e insumos fora das especificações do fabricante devem ser imediatamente segregados, de modo a ter o seu uso impedido.⁽¹³⁾

A gestão de insumos constitui-se de extrema importância para garantir o correto funcionamento do laboratório, impactando diretamente as atividades dos diversos setores e, conseqüentemente, o laudo liberado aos pacientes e médicos. Não havendo uma sinergia entre os processos de cotação, compra, recebimento, armazenagem e distribuição de insumos aos setores técnicos, o paciente pode ser prejudicado com a não emissão dos resultados dos seus exames.

Assim, este trabalho surge durante os preparativos para a implantação do Sistema de Gestão da Qualidade na empresa onde este estudo foi desenvolvido, e, diante do exposto, visa discorrer sobre a importância de uma correta gestão de estoque por meio de estudo de caso realizado em um laboratório clínico privado localizado em Fortaleza, Ceará.

MÉTODOS

Este artigo trata-se de um estudo observacional, prospectivo e descritivo, desenvolvido em forma de estudo de caso nas dependências de um Laboratório de Análises Clínicas privado na cidade de Fortaleza, Ceará. As observações ocorreram ao longo dos meses de outubro de 2018 a maio de 2019. Para tanto, foram realizadas as seguintes atividades: (1) Levantamento e diagnóstico da estrutura física destinada ao setor de almoxarifado; (2) Observação da rotina de trabalho dos responsáveis pelo setor de almoxarifado do laboratório; (3) Detalhamento dos tipos de reagentes e insumos geridos pelo setor de almoxarifado; (4) Diagnóstico situacional da gestão de estoque existente no setor de almoxarifado.

ÉTICA

Os aspectos éticos foram resguardados nesta pesquisa, de forma que os colaboradores entrevistados não tiveram sua identidade revelada, bem como assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dada a natureza do trabalho, não foi necessária submissão ao comitê de ética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste trabalho, foi feita uma observação visando descrever a estrutura física do espaço destinado ao almoxarifado do laboratório alvo da pesquisa. O laboratório possui uma ampla área construída, sendo disposto em três pavimentos (subsolo, térreo e primeiro andar), cada um com aproximadamente 900m², totalizando uma área física construída superior a 3200m².

O laboratório no qual este estudo foi realizado possui funcionamento desde o final de 2013, atuando na realização de exames de análises clínicas com foco no atendimento B2B a estabelecimentos de saúde localizados em Fortaleza e Região Metropolitana, bem como municípios interioranos das regiões Norte, Sertão Central, Sertão dos Inhamuns e Vale do Jaguaribe. A empresa realiza exames nas áreas de Bioquímica, Imunologia, Hormônios, Hematologia, Microbiologia, Urinálise, Parasitologia, Citologia e Biologia Molecular, com rotina automatizada e semiautomatizada para cerca de 80% dos exames realizados *in situ*, operando máquinas de plataformas conceituadas no mercado.

A área técnica do laboratório está dividida em dois pavimentos, contando também com espaço destinado ao armazenamento temporário de amostras, recepção e triagem de materiais, DML, expurgo e área de armazenamento temporário de resíduos comuns e infectantes. Já as áreas de armazenamento e almoxarifado estão localizadas no subsolo em dois setores distintos, sendo um setor destinado ao armazenamento de produtos em temperatura ambiente e outro setor destinado ao armazenamento de produtos refrigerados, onde está instalada uma câmara fria industrial de aproximadamente 16m².

Na área física destinada aos produtos armazenados em temperatura ambiente, há vários armários de aço onde estão dispostos os mais diferentes tipos de insumos, como tubos e agulhas para coleta sanguínea, frascos coletores de fezes e urina, *kits* para realização de exames em equipamentos automatizados, sendo todos os produtos organizados por meio de códigos numéricos.

Há ainda *pallets* plásticos sobre os quais estão armazenadas caixas contendo insumos e soluções para uso nos equipamentos variados dos laboratórios. Em condições normais de abastecimento, o empilhamento máximo das caixas segue as recomendações do fornecedor, não passando

de três caixas empilhadas. Há uma pequena placa com a codificação numérica dos reagentes sem, contudo, haver nenhuma descrição relacionada aos nomes do insumo ou equipamento ao qual se destinam.

O ambiente é mantido climatizado por meio de um aparelho de condicionador de ar de 18 mil BTUs ajustado para funcionar à temperatura de 24°C. O controle da temperatura e umidade do ambiente, necessário para esse tipo de armazenagem, é feito por meio de um termo-higrômetro, mas não há na sala nenhuma planilha de registro e controle dessas variáveis, o que deixa patente a ausência de registros desses indicadores. Evidenciou-se ainda que termo-higrômetro não possui registro de calibração, indo contra o recomendado pela norma PALC.

Quando questionados acerca da não existência da planilha de registros ou dos selos de calibração do equipamento, os colaboradores demonstraram desconhecimento acerca dessa recomendação. Ressalta-se que a calibração de equipamentos de medição é um dos pontos solicitados pelas principais entidades acreditadoras em laboratórios clínicos.

Já no ambiente destinado à câmara fria, no qual a temperatura é mantida entre 2°C a 8°C, há um único termômetro acoplado à caixa de controle da própria câmara fria, não havendo nenhum outro instrumento de aferição da temperatura interna. Isso evidencia que, havendo algum problema de aquecimento ou resfriamento em excesso, não haveria registros, uma vez que também não há a presença de planilha de registro e controle de temperatura.

Foi observado que a disposição interna dos *kits* de reagentes é boa, facilitando o acesso aos mesmos e a fácil reposição. Entretanto, foi observada a presença de *kits* com validade mais longa na frente daqueles com validade mais curta, o que pode acarretar sérios prejuízos financeiros à empresa, uma vez que não há um sistema que sinalize a existência de lotes de reagentes com a data de expiração próxima.

Quando questionados sobre o fato de alguns *kits* de reagentes estarem dispostos de modo inadequado em relação à data de expiração, os colaboradores foram enfáticos ao dizer que observam a validade dos *kits* no momento da entrega ao setor solicitante. Isso mostra que pode haver falhas na gestão da validade dos itens em estoque e, conseqüentemente, prejuízo financeiro caso o colaborador tenha sua atenção desviada durante o processo de separação dos insumos.

Já em relação à rotina de trabalho de dois funcionários do setor de almoxarifado do laboratório, foram observados aspectos referentes ao nível de capacitação de cada colaborador para o correto exercício de suas funções, bem como as condições de trabalho às quais os mesmos estão submetidos.

Os dois colaboradores apresentam níveis distintos de conhecimento relativo ao processo de aquisição de bene e

insumos, armazenagem e distribuição. O encarregado pela gerência do setor demonstra ter domínio em softwares de uso comum na empresa, bem como no software específico para gestão de almoxarifado. O encarregado do setor frequentemente orienta seu par de função, que demonstra uma certa dificuldade em lidar com múltiplos pedidos, apesar de exercer a função no mesmo laboratório há mais tempo, cerca de dois anos a mais do que o seu superior imediato.

A empresa possui um software de gestão de almoxarifado (AG) bastante robusto, porém subutilizado. Não há a realização, por parte dos colaboradores, de registros eletrônicos de ordens de compras, importação de notas fiscais ou qualquer outra funcionalidade mais elaborada. O uso do gerenciador é realizado apenas para dar entrada e/ou saída de itens, sem identificar dados referentes a solicitantes, validade e lote dos insumos, preço médio de aquisição e curva BC de itens utilizados.

Para Martelli e Dandaro,⁽⁷⁾ o primeiro passo para realizar uma boa gestão de estoque é possuir um sistema confiável que auxilie a administração de todo o material existente e possua funcionalidades que maximizem o tempo destinado às atividades de recepção, organização, gerência e distribuição dos itens.

Em conformidade com o referido pensamento é possível assumir que a empresa apresenta prejuízo financeiro ao pagar por um software robusto e o mesmo não ser utilizado corretamente, seja por falta de treinamento ou de empenho dos colaboradores em aprender as demais funções que fogem à sua rotina. O custo de manutenção anual do software é de aproximadamente R\$ 8 mil reais[i], quantia essa que poderia ser mais bem empregada com o uso completo do sistema de gestão de estoques.

Em relação aos insumos geridos pelo setor de almoxarifado, o setor é responsável pela compra, recebimento, armazenamento, organização e distribuição de itens de limpeza, material de expediente, material de escritório e papelaria, peças de reposição para equipamentos, material de coleta sanguínea, material de coleta de amostras biológicas diversas e reagentes laboratoriais. Ao total, são mais de 2.000 itens diferentes sob a responsabilidade do setor de almoxarifado, composto apenas por duas pessoas que não possuem formação de nível técnico ou superior na área de atuação do laboratório. Isso implica frequente separação de materiais diferentes do que fora solicitado pelos diferentes setores do laboratório, gerando retrabalho.

Rodrigues e Oliveira⁽¹⁴⁾ destacam que a gestão de estoque feita de maneira eficaz traz eficiência operacional e melhora o desempenho nas finanças de uma empresa.

i Por questões estratégicas, a empresa não autorizou a divulgação de notas fiscais dos pagamentos realizados à empresa de tecnologia fornecedora do software de gestão de estoque. Os valores apresentados neste artigo foram obtidos por meio de entrevista com o responsável pelo setor financeiro do laboratório.

Dessa forma, tal gestão deve estar alinhada aos objetivos organizacionais, necessitando com isso que os gestores possam melhorar seu conhecimento técnico das atividades que desempenham.

Por fim, ao realizar o diagnóstico situacional da gestão de estoque existente no setor de almoxarifado, foi verificado que, apesar de a empresa existir há mais de seis anos, não há de fato uma política instituída para a gestão do almoxarifado e estocagem de insumos. Grande parte dos processos é realizada de modo empírico, estando dependente do conhecimento de dois únicos colaboradores, demonstrando assim falta de formação continuada adequada. Assim, a possibilidade de ocorrer erros é patente. Entretanto, este estudo irá propor oportunidades de melhorias (Quadro 1) baseadas na literatura vigente de modo a auxiliar a corrigir as falhas observadas. Espera-se que, com os preparativos para o início do processo de acreditação do sistema da qualidade, sejam implantados documentos que norteiem as atividades dos colaboradores e melhorem os fluxos financeiros e operacionais do laboratório.

CONCLUSÕES

Diante do exposto, a gestão de estoque tem papel primordial na saúde de qualquer empresa, visto que controla uma parcela importante dos ativos da organização. Estoques elevados e mal administrados encarecem o custo final de disponibilidade de exames, uma vez que diversos reagentes têm validade curta e podem ficar indisponíveis para uso.

Ao mesmo tempo, um estoque mantido em níveis críticos pode ser fatal para a operação do laboratório clínico, pois não havendo *kits* e reagentes em estoque, não

é possível a realização dos exames e, conseqüentemente, os pacientes podem ser prejudicados pelo não diagnóstico de sua saúde pelo profissional médico.

Nesse sentido, foi verificado que a adoção de sistemas de gestão de estoque, aliada a treinamento contínuo dos colaboradores, estabelecimento de documentação que detalhe e organize a atuação do setor, bem como a presença de um gestor de qualidade mais ativo são essenciais para o controle dos *kits*, reagentes e materiais existentes no estoque do laboratório.

Considera-se, assim, que somente após a adoção de boas práticas de qualidade voltadas à gestão de estoque o laboratório poderá ser acreditado para esse item das normas das principais organizações acreditadoras.

Abstract

Objective: This paper aims to discuss the correct management of inputs in a clinical analysis laboratory. In this type of activity, the Quality Management System is based on a series of processes aimed at guaranteeing the reliability of results, based on well-established processes. The management of inputs and stock is an integrated activity among the various sectors existing in the company, essential for ensuring the quality of the exam. Thus, failures in quality policy can trigger material, institutional and human losses. Methods: For this purpose, an analysis was carried out in a private clinical laboratory in Fortaleza, Ceará, in an observational, prospective and descriptive manner, developed as a case study. Results: It was found that, although inventory management systems are adopted, there is no effective training and detailed documentation to guide all processes in the sector. Conclusion: The absence of well-defined inventory management processes can be an important interferer in the correct release of examination reports, generating significant losses to the organization and the customer.

Keywords

Quality Management; Strategic Stockpile; Laboratory

Quadro 1 – Problemas observados e oportunidades de melhoria

Problema observado	Provável causa	Sugestão de melhoria
Não há descrição clara dos itens mantidos em estoque.	Os responsáveis pelo almoxarifado possuem conhecimento intrínseco dos itens geridos.	Melhorar a comunicação visual das prateleiras de armazenamento, detalhando o setor e/ou equipamento no qual o insumo é utilizado.
Não há planilha de registro e controle de temperatura e umidade dos setores de almoxarifado.	Desconhecimento das normas de controle de qualidade.	Capacitar os colaboradores do setor nas normas do SGQ (Sistema de Gestão da Qualidade).
Não há evidência dos registros de calibrações do termo-higrômetro existente no setor	Não foi realizada calibração do equipamento por empresa aferidora.	Realizar a calibração dos equipamentos métricos de acordo com as normas de SGQ.
Os colaboradores demonstraram não saber da necessidade de manter equipamentos de medição calibrados.	Desconhecimento das normas de controle de qualidade.	Capacitar os colaboradores do setor nas normas do SGQ (Sistema de Gestão da Qualidade).
Há <i>kits</i> com validade mais longa à frente daqueles com validade mais curta dispostos nas estantes.	A organização dos materiais nas estantes não foi feita corretamente.	Formação continuada aos colaboradores, com ênfase na gestão de estoques.
Não há registro eletrônico em sistema de gestão de estoque das ordens de compra de insumos.	Os colaboradores desconhecem a função.	Realizar treinamento do software utilizado pela empresa.

REFERÊNCIAS

1. Paladini EP, Carvalho MM. Gestão da qualidade. Teoria e casos. Rio de Janeiro: Editora Campus, 2005.
2. Ribeiro AF. Taylorismo, fordismo e toyotismo. Lutas Sociais. 2015. Jul; 35(19):65-79.
3. Kluck M, Guimarães JR, Ferreira J, Prompt CA. A gestão da qualidade assistencial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: implementação e validação de indicadores. RAS. 2002. 4(16):27-32.
4. Vieira KF, Shitara ES, Mendes ME, Sumita NM. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2011. Jun; 47(3): 201-210.
5. Chaves CD. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(5):352.
6. Martelli A. Gestão da Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2011;13(Esp):363-8.
7. Martelli LL, Dandaro F. Planejamento e controle de estoque nas organizações. Revista Gestão Industrial. 2015; 11 (02):170-185.
8. Ballou RH. Gerenciamento da cadeia de suprimentos: Planejamento, organização e logística empresarial. Tradução Elias Pereira. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
9. Martins PG, Campos Alt PR. Administração de Materiais e Recursos Patrimoniais. São Paulo: Saraiva, 2009.
10. Bowersox DJ, Closs DJ, David J, Cooper M. Gestão Logística de Cadeias de Suprimentos. São Paulo, Editora Bookman, 2006.
11. Slack N, Chambers S, Harland C, Harrison A, Johnston R. Administração da produção. 3.ed. São Paulo: Atlas, 2009.
12. Provin TD, Sellitto AM. Política de Compra e Reposição de Estoques em uma Empresa de Pequeno Porte do Ramo Atacadista de Materiais de Construção Civil. Revista Gestão Industrial. 2011. 07(02): 187-200.
13. SBPC/ML. Comissão de Acreditação de Laboratórios Clínicos (CALC) - Norma do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) - versão 2016.
14. Rodrigues CCP, Oliveira JO. Um Estudo Sobre a Gestão de Estoques Intermediários em Uma Empresa Brasileira de Manufatura de Produtos à Base de Papel. IV Congresso Nacional de Excelência em Gestão. 2008. Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Correspondência

Charles Ielpo Mourão

Universidade Estadual do Ceará

Curso Ciências Biológicas - Centro de Ciências da Saúde
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Campus do Itaperi, Fortaleza-CE

E-mail: c_ielpo@yahoo.com.br

Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de um hospital público de Aracaju, Sergipe

Antimicrobial sensitivity profile analysis of a public hospital in Aracaju, Sergipe

Henrique Francisco de Almeida¹

Roberta Oliveira da Silva²

Mônica Batista de Almeida³

Flávia de Almeida⁴

Jéssica Santos Menezes⁵

Thays Almeida Pereira Dias⁶

Resumo

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo analisar os perfis microbiológicos e de sensibilidade dos anos de 2017 e 2018 das Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatal, pediátrica e adulto de um hospital público de Aracaju, Sergipe. **Métodos:** Mediante a coleta secundária dos dados coletados com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). **Resultados:** Foram observados, neste estudo, alguns mecanismos de resistência, como: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de b-lactamase de Espectro Estendido (ESBL), *Enterobacter* spp ESBL, *P. aeruginosa* ERC e *Providencia stuartii* ESBL, todas elas isoladas na UTI neonatal. Os antibióticos que demonstraram menores índices de sensibilidade na média geral para os microrganismos isolados foram: gentamicina, ampicilina e amoxicilina+ clavulanato. As drogas que apresentaram maiores índices de sensibilidade foram: colistina, polimixina B, amicacina, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, linezolida, cefepima, piperacilina+tazobactam, vancomicina e teicoplanina. **Conclusão:** Diante disso, é imprescindível a conscientização dos profissionais de saúde juntamente com a comunidade, em relação à adequada prestação de serviços aos pacientes internados e quanto ao uso racional de antimicrobianos e, dessa maneira, contribuir para a redução das taxas de resistência bacteriana.

Palavras-chave

Farmacorresistência Bacteriana; UTI; Testes de Sensibilidade a antimicrobianos

INTRODUÇÃO

Os antibióticos são medicamentos que são utilizados como recursos terapêuticos para tratar doenças infecciosas provocadas por microrganismos e, dessa maneira, diminuem os índices de morbimortalidade relacionados às infecções causadas por bactérias.⁽¹⁾ A resistência a esses antimicrobianos disponíveis para a terapêutica é um problema que cresce em ritmo acelerado no mundo. Esse fenômeno ocorre devido à ineficácia de antibióticos que são comumente empregados para microrganismos outrora sensíveis e que, agora, tornaram-se resistentes à ação desses medicamentos.⁽²⁾

A resistência microbiana acontece de forma natural mediante a herança genética de plasmídeos, por meio da pressão seletiva provocada pelo antibiótico quando as bactérias suscetíveis são eliminadas, ficando apenas as

resistentes, as quais passam a se reproduzir, e, também, por intermédio de mutações.^(3,4)

No entanto, há fatores que agilizam esse processo, a saber: o uso inadequado de antimicrobianos nos seus mais variados âmbitos, seja pelos profissionais de saúde, pela sociedade ou em animais, prática essa amplamente utilizada.⁽⁵⁾ Um dos ambientes onde a resistência antimicrobiana propaga-se com intensa rapidez é o hospitalar.⁽⁶⁾ Esse centro de saúde é um local propício para a ocorrência de infecções por microrganismos resistentes e multirresistentes, primeiramente, porque é um ambiente com uma grande variedade de micróbios e, também, porque é neste âmbito que se encontra um considerável contingente de pacientes com enfermidades, tornando-os vulneráveis por causa da sua situação clínica, e por, na maioria dos casos, serem submetidos a diversos procedimentos invasivos, o

¹ Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe.

² Graduada em Farmácia pela Universidade Tiradentes.

³ Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Sergipe.

⁴ Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Sergipe.

⁵ Graduada em Enfermagem pela Faculdade Estácio de Sergipe.

⁶ Graduada em Biomedicina pela Universidade Paulista.

Instituição: Universidade Tiradentes. Aracaju - SE, Brasil.

Recebido em 14/09/2020

Aprovado em 07/05/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102066

que o faz entrar em um quadro de debilidade imunológica e, assim, mais suscetível a adquirir infecções.⁽⁷⁾

A equipe de saúde empenhada em tratar os pacientes com quadros infecciosos utiliza-se de antimicrobianos. Por muitas vezes, esses medicamentos são usados de forma irracional, seja pelo uso de maneira excessiva ou pela ausência de necessidade de tratamento com esses fármacos.^(8,9) O uso indiscriminado de antibióticos promove o aumento e a disseminação da resistência bacteriana, o que torna mais difícil a intervenção nas doenças infecciosas, devido à ausência de medicamentos que tratem essas enfermidades.^(10,11)

Sendo assim, entende-se, também, que a dificuldade em tratar as infecções interfere diretamente na duração do tempo de hospitalização, o que eleva os custos hospitalares, reduz as opções terapêuticas eficazes, bem como aumenta as taxas de mortalidade dos pacientes internados.⁽⁶⁻¹²⁾ Além do uso irracional de medicamentos utilizados no combate às enfermidades bacterianas, outra forma de propagação da resistência microbiana, no contexto hospitalar, é por meio das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS),^(13,14) cujo termo é uma substituição e uma ampliação do conceito de Infecção Hospitalar (IH).⁽¹⁵⁾

As IRAS são adquiridas, dentre outras maneiras, através da contaminação cruzada que é uma forma de disseminação de microrganismos patogênicos. Essa transmissão está relacionada aos pertences e equipamentos que estão em volta de indivíduos colonizados, os quais servem de reservatório para as bactérias.⁽¹⁶⁾ O interesse por esse tema surgiu devido à necessidade de conscientização por parte dos profissionais de saúde e da população quanto ao uso racional de antimicrobianos, visto que a utilização indiscriminada destes eleva os índices de resistência bacteriana. Neste sentido, a presente pesquisa tem como objetivo identificar quais são as principais bactérias causadoras de infecção e qual a incidência desses patógenos, buscando avaliar o perfil de sensibilidade desses microrganismos em um hospital público de Aracaju – Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal, realizado em um hospital público localizado em Aracaju – Sergipe. A coleta secundária dos dados foi realizada mediante a autorização da administração da instituição hospitalar, conforme o termo de compromisso e aceite de realização da pesquisa concedido pela Coordenação do Serviço de Educação Continuada do hospital. Foram coletados e analisados os registros e relatórios de cepas bacterianas e de alguns fungos provenientes de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) neonatal, pediátrica e adulto, que realizaram culturas de material biológico com o teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), no período compreendido entre janeiro de 2017 a dezembro de 2018. Esses materiais foram fornecidos pela Comissão de

Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), que possuía esses dados devidamente registrados. Durante a realização da coleta de dados não foi necessário ter acesso aos dados dos pacientes internados, por isso não foi preciso submeter este estudo ao comitê de ética.

Portanto, não foi necessário aplicar o termo de consentimento livre e esclarecido. É mister ressaltar que esse método está de acordo com os estudos realizados por Bordignon e Lima⁽⁷⁾ e Santos et al.,⁽⁴⁾ os quais desenvolveram o mesmo tipo de pesquisa em um hospital do sudoeste do Paraná e em outra instituição localizada em Macapá, no estado do Amapá, respectivamente. Para a tabulação dos resultados, foi utilizado o software Excel 2018, em que foram utilizados gráficos, nos quais contêm os principais microrganismos isolados, a sua incidência e os perfis de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos. Os dados foram analisados pela estatística descritiva.

RESULTADOS

Primeiramente, foram coletados e analisados os perfis microbiológicos e de sensibilidade dos anos de 2017 e 2018 provenientes das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) neonatal, pediátrica e adulto. No perfil microbiológico da UTI Neonatal de 2017 foram isolados quatro tipos de bactérias, com prevalência de espécies de *Enterobacter* spp., com seis ocorrências (46,1%), seguidos de *Escherichia coli* com quatro achados (30,8%), *Pseudomonas* spp. com duas ocorrências (15,4%) e *Serratia* spp. com uma ocorrência (7,7%). Em 2018, o número de espécies isoladas evoluiu para 17 tipos. Houve elevadas taxas de infecções por *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), no total de 18 isolados (30%), *S. aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com nove e três achados, respectivamente, o que equivale, no total, a 20% dos casos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* b-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) com cinco ocorrências cada (totalizando 18%), *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp. ESBL, *P. aeruginosa*, Enterobactéria Resistente aos Carbapenêmicos (ERC) e Leveduras com três casos cada (no total de 20%), *Listeria monocytogenes*, *Serratia* (spp. e *marcescens*), com duas ocorrências cada (no total de 6%) e, por fim, *Morganella morganii*, *Streptococcus agalactiae* e *Providencia stuartii* ESBL, com um caso cada (totalizando 6%).

No perfil microbiológico da UTI Pediátrica do ano de 2017 foram isolados seis tipos de microrganismos, com destaque na prevalência de cepas pertencentes às enterobactérias, no total de quatro ocorrências (30,8%), seguidos de *Pseudomonas aeruginosa*, com dois achados (15,4%), *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis* com uma ocorrência (23%). Foram isolados também fungos do gênero *Candida* spp. (quatro casos, 30,8%).

Já no ano de 2018 houve uma mudança no quadro de ocorrências. Houve, no total, 61 achados, sendo que prevaleceu casos de infecções por *P. aeruginosa* (22 casos,

o que corresponde a 36%), seguidos de *Staphylococcus coagulase negativa* (sete casos, 11,7%), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com seis casos cada (19,7%), *Enterobacter cloacae* (três casos, 4,9%) *Klebsiella* spp. e *Klebsiella pneumoniae* com uma e duas ocorrências, respectivamente, o que equivale a 4,9% dos achados; as espécies de *Acinetobacter* spp., *Serratia* spp., *Burkholderia cepacea*, *Stenotrophomonas maltophilia* correspondem a 6,5% das ocorrências, equivalente a um caso cada microrganismo. Foram isoladas espécies de *Candida* spp. (seis achados, 9,8 %) e Leveduras (quatro ocorrências, 6,5%).

No perfil microbiológico da UTI Adulto do ano de 2017 foram isolados quatro tipos de microrganismos, são eles: *Enterobacter* spp. com quatro ocorrências (57%), *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. e *Enterococcus* spp. com um achado cada (no total de 43%). Já em 2018 foram isoladas 10 tipos com destaque para a prevalência de infecções por *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* com sete ocorrências cada (no total de 43,7%), *Acinetobacter* spp. com cinco achados clínicos (15,6%), *S. aureus* com quatro ocorrências (12,5%), *Enterococcus* spp. com três casos (9,4%), *Klebsiella oxytoca* com duas ocorrências (6,3%), *Pseudomonas* spp., *SCN*, *Candida* spp. e Leveduras com um achado cada (totalizando 12,5%). A Tabela 1 traz a incidência dos microrganismos isolados nas UTIs Neonatal, Pediátrica e Adulto dos anos de 2017 e 2018.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foram realizados para os microrganismos mais incidentes em cada um dos setores envolvidos no estudo no período de 2017 e 2018. Os resultados dos testes da UTI Neonatal no ano de 2017 para as cepas das enterobactérias evidenciaram algumas classes de antibióticos que mostraram sensibilidade igual e/ou inferior a 50%, sendo eles: amicacina e ciprofloxacino (50%), aztreonam (40%), ceftriaxona e cefotaxima (33,33%), cefalotina e cefepime (20%) e gentamicina (16,67%). Apenas para a associação entre piperacilina+tazobactam, as bactérias apresentaram 100% de sensibilidade, seguidos de imipenem e meropenem (83,33%) e sulfametoxazol+trimetoprim (60%), enquanto que se apresentaram 100% resistentes à associação entre amoxicilina+clavulanato.

O perfil de sensibilidade das *Escherichia coli* demonstra que elas apresentaram sensibilidade igual e/ou inferior aos seguintes antimicrobianos: sulfametoxazol+trimetoprim, cefazidima e aztreonam (50%), cefalotina (33,33%), enquanto que se mostraram totalmente sensíveis a amicacina, ciprofloxacino, nitrofurantoina, meropenem e imipenem, seguidos de ceftriaxona, cefepime, cefotaxima e amoxicilina+clavulanato (66,67%).

Para o ano de 2018, foram realizados TSA para *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), *S. aureus* e MRSA. Os antibióticos utilizados nos testes e as porcentagens de sensibilidade para SCN estão descritos a seguir: os antimicrobianos que apresentaram sensibilidade nas culturas igual e/ou inferior a 50% foram: ciprofloxacino, clindamicina, sulfametoxazol+trimetoprim (50%), tetraciclina (33%),

ampicilina+sulbactam, cefepime, cefoxitina, meropenem, oxacilina e piperacilina+tazobactam (25%). Essa cepa foi totalmente resistente a ampicilina, azitromicina, cefaclor, penicilina G, cefazolina, eritromicina e gentamicina.

O perfil de sensibilidade para *S. aureus* e MRSA demonstra que elas apresentaram total sensibilidade para azitromicina, cefaclor, cefazolina, linezolida, rifampicina e tetraciclina, seguidos por, em ordem decrescente, para clindamicina, eritromicina, sulfametoxazol+trimetoprim (40%) e gentamicina (20%). Esses microrganismos foram totalmente resistentes à ampicilina e à penicilina G.

Na UTI Pediátrica, os resultados do TSA de 2017 para as cepas das enterobactérias evidenciaram algumas classes de antibióticos que mostraram sensibilidade igual e/ou inferior a 50%, sendo eles: gentamicina (50%), ceftriaxona/cefotaxima e cefepime (25%). Amicacina e meropenem foram os únicos antimicrobianos que apresentaram 100% de sensibilidade nas culturas, seguidos de ciprofloxacino (75%).

O perfil de sensibilidade das *P. aeruginosa* revela que as cepas mostraram uma sensibilidade de 50% para amicacina/gentamicina, enquanto que se apresentaram 100% resistentes ao ciprofloxacino. Para o ano de 2018, foram realizados TSA para as espécies de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os antibióticos utilizados nos testes e as porcentagens de sensibilidade da *P. aeruginosa* estão descritos a seguir: amicacina e gentamicina (64%), cefepime (36%), piperacilina+tazobactam (82%), imipenem/meropenem e ciprofloxacino (63%). A cepa demonstrou sensibilidade de 100% apenas para colistina (polimixina E) e a polimixina B. A espécie de *S. aureus* mostrou 100% de resistência para ampicilina, ampicilina+sulbactam e 50% para clindamicina, enquanto que para vancomicina, teicoplanina e linezolida foram totalmente sensíveis.

O perfil de sensibilidade para o ano de 2017 na UTI Adulto revelou que a *Enterobacter* spp. teve sensibilidade para ceftriaxona/cefotaxima (33%), cefepime e gentamicina (50%) amicacina e ciprofloxacino (67%) e meropenem (80%). Já o perfil de sensibilidade de 2018 foi realizado unicamente para as cepas de *Acinetobacter* spp., sendo sensíveis para os seguintes antimicrobianos: gentamicina (50%), amicacina (33,33%), cefepime, piperacilina+tazobactam, ciprofloxacino e meropenem (25%). A única droga que as bactérias mostraram-se totalmente sensíveis foi a colistina. Para fins de ajuste na Tabela 2, a qual mostra a porcentagem de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos para cada espécie de bactérias, ficou definido que os nomes das bactérias serão descritos da seguinte forma:

- *Enterobacter* spp: X₁;
- *Escherichia coli*: X₂;
- *Staphylococcus coagulase negativa*: X₃;
- *Staphylococcus aureus*: X₄;
- *Staphylococcus aureus* resistente à metilina: X₅;
- *Pseudomonas aeruginosa*: X₆;
- *Acinetobacter* spp.: X₇.

Tabela 1 - Incidência dos microrganismos isolados nas UTIs Neonatal, Pediátrica e Adulto dos anos 2017 e 2018

	Neonatal					Pediátrico				Adulto	
	2017		2018			2017		2018		2017	2018
Antibióticos/bactérias	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₁	X ₆	X ₆	X ₄	X ₁	X ₇
Amicacina	50	100	-	-	-	100	50	64	-	67	33,33
Amox + clav ¹	0	66,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amp+sub ²	-	-	25	-	-	-	-	-	0	-	-
Ampicilina	-	-	0	0	0	-	-	-	0	-	-
Azitromicina	-	-	0	100	100	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	40	50				-	-	-	-	-	-
Cefaclor	-	-	0	100	100	-	-	-	-	-	-
Cefalotina	20	33				-	-	-	-	-	-
Cefazolina	-	-	0	100	100	-	-	-	-	-	-
Cefepime	20	66,67	25	-	-	25	100	36	-	50	25
Cefotaxima	33,33	66,67	-	-	-	25			-	33	-
Cefoxitina	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidina	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftriaxona	33,33	66,67	-	-	-	25	-	-	-	33	-
Ciprofloxacino	50	100	50	-	-	75	0	63	-	67	25
Clindamicina	-	-	50	40	40	-	-		50	-	-
Colistina	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100
Eritromicina	-	-	0	40	40	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	16,67	-	0	20	20	50	-	64	-	50	50
Imipinem	83,33	100	-	-	-	-	-	63	-	-	-
Linezolida	-	-		100	100	-	-		100	-	-
Meropenem	83,33	100	25	-	-	100	100	63	-	80	25
Nitrofurantoina	-	100				-	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina G	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Pipe+tazo ³	100	-	25	-	-	-	100	82	-	-	25
Polimixina B	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
Rifampicina	-	-		100	100	-	-	-	-	-	-
Smt+tmp ⁴	60	50	50	40	40	-	-	-	-	-	-
Teicoplanina	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
Tetraciclina	-	-	33	100	100	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-

*β-lactamase de espectro estendido¹

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Porcentagem de sensibilidade dos antibióticos utilizados no TSA para cada espécie de bactérias

Microrganismos	Neonatal		Pediátrico		Adulto	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
<i>Acinetobacter</i> spp	-	-	-	1	-	5
<i>Burkholderia cepacea</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Candida</i> spp	-	-	4	6	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	3	-	-
<i>Enterobacter</i> spp ESBL ¹	-	3	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	6	-	4	-	4	-
<i>Enterobactéria</i> Resistente aos Carbapenêmicos	-	3	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp	-	3	-	-	1	3
<i>Escherichia coli</i>	4	5	-	6	-	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	2	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL ¹	-	5	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp	-	-	-	1	-	-
Leveduras	-	3	-	4	-	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	2	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i> ESBL ¹	-	1	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3	2	22	-	7
<i>Pseudomonas</i> spp	2	-	1	-	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	-	2	-	-	-	-
<i>Serratia</i> spp.	1	2	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9	-	6	-	4
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina	-	3	-	-	-	1
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	-	18	-	7	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	1	-	-	-	-
Total	13	64	13	61	7	32

*Amoxicilina+Clavulanato¹, Ampicilina+Sulbactam², Piperacilina+Tazobactam³, Sulfametoxazol+Trimetoprim⁴. Entende-se 0 referente a 100% de resistência.

DISCUSSÃO

De acordo com os autores Blair et al.⁽¹⁷⁾ e Lima et al.,⁽¹⁸⁾ as bactérias desenvolvem e utilizam-se de vários mecanismos de sobrevivência, a fim de resistirem à ação das drogas. Alguns desses mecanismos de resistência foram observados neste estudo, como *Staphylococcus aureus* MRSA (três casos), *Klebsiella pneumoniae* ESBL (cinco casos), *Enterobacter* spp ESBL (três casos), *P. aeruginosa* ERC (três casos) e *Providencia stuartii* ESBL (1 caso), todas elas presentes na UTI neonatal, corroborando com os estudos de Cadot et al.⁽¹⁹⁾ e Bowen et al.,⁽²⁰⁾ que demonstram que os recém-nascidos são mais vulneráveis às infecções por bactérias multirresistentes, devido à sua imaturidade biológica. É importante ressaltar que conforme um estudo realizado, foi evidenciado que a *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patógeno causador de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) em pacientes críticos internados na UTI.⁽²¹⁾

As bactérias que produzem ESBL são capazes de hidrolisar o anel b-lactâmico de todas as classes de antimicrobianos que expressem essa estrutura, por exemplo, as penicilinas, as cefalosporinas e monobactâmicos.^(7,22)

A Figura 1 traz os nomes das espécies de cepas multirresistentes que foram isoladas na UTI neonatal.

No estudo conduzido por Bordignon e Lima,⁽⁷⁾ bem como o presente trabalho, constatou-se que as enterobactérias têm elevadas taxas de resistência aos antibióticos b-lactâmicos, enquanto que o MRSA apresentou sensibilidade

a alguns antimicrobianos dessa classe terapêutica, o que diverge desses autores, que, em seu trabalho, relataram total resistência desse microrganismo a esses fármacos.

Os trabalhos realizados por Almeida et al.⁽²³⁾ e Andrade et al.⁽²⁴⁾ evidenciaram que as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são as que produzem mais comumente as b-lactamases de espectro estendido (ESBL), ou seja, favorecendo a resistência desses microrganismos aos antimicrobianos que possuem o anel b-lactâmico. De acordo com os estudos desenvolvidos por esses autores, foi constatado que as enterobactérias desenvolveram esse tipo de mecanismo de defesa predominantemente em hospitais e que esses patógenos estão relacionados, também, a infecções alimentares através do consumo de frutos do mar (peixes e camarões).

A Tabela 3 mostra a média geral do perfil de sensibilidade para os microrganismos isolados.

Por fim, os antibióticos que demonstraram menores índices nos perfis de sensibilidade na média geral para os microrganismos isolados foram: gentamicina, ampicilina e amoxicilina+clavulanato (utilizados para enterobactérias, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Já as drogas que apresentaram maiores índices de sensibilidade foram: colistina, polimixina B, amicacina, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, linezolida, cefepima, piperacilina+tazobactam, vancomicina e teicoplanina, todas testadas para as mesmas bactérias supracitadas.

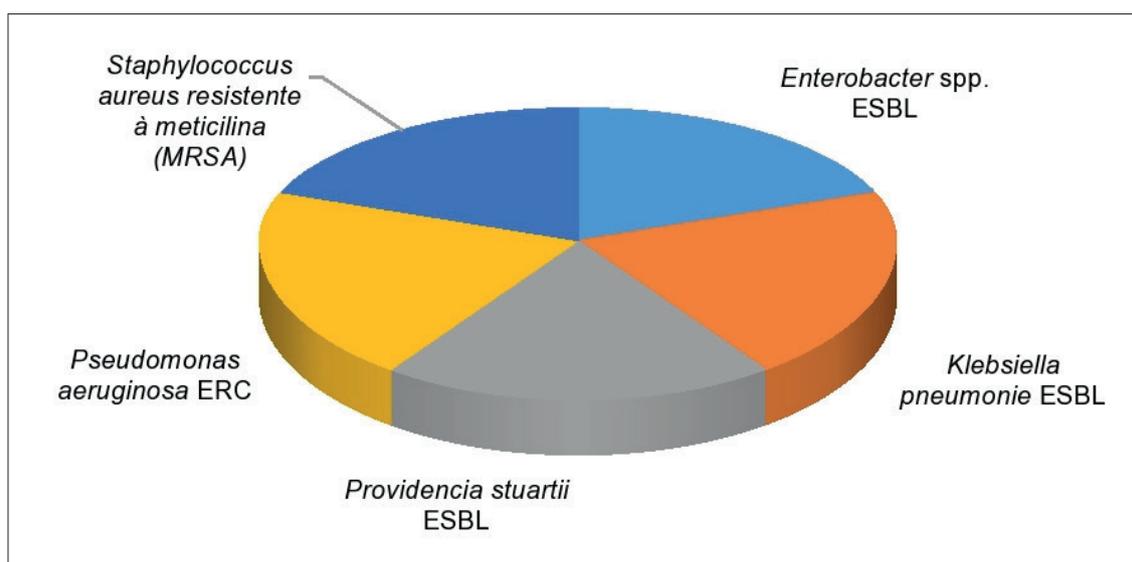


Figura 1. Cepas multirresistentes isoladas na UTI neonatal

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 - Perfil de sensibilidade na média geral para os microrganismos isolados⁽¹⁾

Antimicrobianos	Maiores índices de sensibilidade	Menores índices de sensibilidade
Amicacina	X	-
Amoxicilina+ Clavulanato	-	X
Ampicilina	-	X
Cecefime	X	-
Ciprofloxacino	X	-
Colistina	X	-
Gentamicina	-	X
Imipenem	X	-
Linezolida	X	-
Meropenem	X	-
Piperacilina+Tazobactam	X	-
Polimixina B	X	-
Teicoplanina	X	-
Vancomicina	X	-

*Esses antimicrobianos foram testados para enterobactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*¹
 Fonte: Dados da pesquisa.

CONCLUSÃO

O uso indiscriminado de antibióticos que vai desde a prescrição até o consumo abusivo desses fármacos pela sociedade é um fator relevante que impulsiona o crescimento das taxas de resistência bacteriana mundialmente. O presente estudo teve como finalidade realizar um levantamento da incidência dos microrganismos isolados em pacientes internos nas Unidades de Terapia Intensiva de um hospital público de grande porte do estado de Sergipe, bem como traçar o perfil de sensibilidade desses patógenos aos antimicrobianos padronizados nesta instituição de saúde. Foi evidenciado através da pesquisa que os números de isolamento de microrganismos tiveram um avanço considerável dentro do período de estudo. Observou-se nesta pesquisa a presença de microrganismos multirresistentes como o *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL, *Enterobacter* spp. ESBL, *P. aeruginosa* ERC e *Providencia stuartii* ESBL, os quais representam uma preocupação especial para os pacientes imunodeprimidos.

Trabalhos como este são importantes, porque conseguem monitorar os índices de resistência bacteriana no âmbito hospitalar e, por isso, faz-se mister a adoção de medidas educativas voltadas para os diversos profissionais da saúde, como: médicos, farmacêuticos, enfermeiros, bem como à comunidade, no que se refere à conscientização na utilização adequada dos antimicrobianos. É imprescindível que os profissionais de saúde conscientizem-se acerca da sua conduta inadequada no exercício de suas atribuições no cuidado com os pacientes hospitalizados, a qual é responsável pela disseminação de microrganismos, através da contaminação cruzada.

Medidas como a lavagem correta das mãos e a utilização de álcool 70° GL são práticas simples que podem reduzir, consideravelmente, a propagação desses patógenos. A realização de treinamentos, reuniões, palestras e debates para as equipes de saúde e colaboradores na prestação de serviços são alternativas para a divulgação dessas informações, e dessa maneira, contribuir para a redução das taxas de resistência bacteriana. Por fim, é necessário

orientar a sociedade sobre os riscos do uso inadequado de antibióticos, como a importância de realizar o tratamento completo, mesmo desaparecendo os sintomas durante os primeiros dias; orientar em relação ao correto descarte desses medicamentos e os prejuízos advindos da automedicação.

Abstract

Objective: This study aimed to analyze the microbiological and sensitivity profiles of the years 2017 and 2018 of the neonatal, pediatric and adult Intensive Care Units (ICU) of a public hospital in Aracaju, Sergipe. **Methods:** Through the secondary collection of data collected with the Hospital Infection Control Commission (CCH). **Results:** Some resistance mechanisms were observed in this study, such as: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* producer of Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL), *Enterobacter spp* ESBL, *P. aeruginosa* ERC and *Providencia stuartii* ESBL, all they were isolated in the neonatal ICU. The antibiotics that showed lower levels of sensitivity in the general average for the isolated microorganisms were: gentamicin, ampicillin and amoxicillin + clavulanate. The drugs that showed the highest levels of sensitivity were: colistin, polymyxin B, amikacin, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, linezolid, cefepime, piperacillin + tazobactam, vancomycin and teicoplanin. **Conclusion:** Therefore, it is essential to raise the awareness of health professionals together with the community, regarding the adequate provision of services to hospitalized patients and regarding the rational use of antimicrobials and, in this way, contribute to the reduction of bacterial resistance rates.

Keywords

Bacterial Drug Resistance; ICU; Antimicrobial Susceptibility Test

REFERÊNCIAS

- Costa ALP, Junior ACSS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2017; 7(2): p. 45-57.
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa Saúde Pública*. 2016; 34(1): pp.77-84.
- Pereira SCL, Ribeiro RS, Bazzolli DMS, Vanetti MCD. Resistência a antibióticos e presença de plasmídeos em enterobactérias e *Staphylococcus aureus* isoladas do setor de dietética de um hospital público. *O Mundo da Saúde*. 2015; 39(2): p. 147-156
- Santos MJA, Porcy C, Menezes RAO. Etiologia e perfil de resistência bacteriana em uroculturas de pacientes atendidos em um hospital público de Macapá-Amapá, Brasil. *Um estudo transversal. Diagnóstico e Tratamento*. 2019; 24(4): 135-142.
- Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015; 40(4): p. 277-283.
- Ribeiro M, Cortina AM. Bactérias de relevância clínica e seus mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). *Revista Científica UMC*. 2016; 1(1).
- Bordignon JC, Lima LR. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná; *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2017; 49(3): p. 283-288.
- Rocha IV, Ferraz PM, Farias TGS, Oliveira SR. Resistência de bactérias isoladas em equipamentos em unidade de terapia intensiva. *Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico*. 2015; 28(5): p. 433-439.
- Rodrigues TS, Santos AMR, Lima PC, Moura MEB, Goiano PDOL, Fontinele DRS. Resistência Bacteriana a Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*. 2018; 4:7350.
- Santos DVA, Oliveira GA, Pacheco LG, Faria LMO, Cunha JC, Mello TM. Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. *Revista Científica Multidisciplinar das Faculdades São José*. 2018; 11(1): p. 02-14.
- Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microbial Drug Resistance*. 2019; 00 (00).
- Oliveira LMS, Santos EM, Costa YGF, Oliveira TL, Rodrigues MML. Perfil de Resistência Bacteriana aos Carbapenêmicos nas Clínicas de um Hospital Universitário. *GEP NEWS*. 2017; 1(2): p.56-58.
- Modesto EM, Brito DVD. Infecções relacionadas à assistência à saúde em recém-nascidos de alto risco: perfil de resistência dos bacilos Gram negativos. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 2019; 11(7).
- Wachholtz MA, Costa AEK, Pissaiá LF. Conhecimento dos enfermeiros de uma unidade de terapia intensiva sobre infecções relacionadas à assistência em saúde. *Research, Society and Development*. 2019; 8(10): e378101397.
- Padoveze MC, Fortaleza CMCB. Infecções associadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista Saúde Pública*. 2014; 48(6): p. 995-1001.
- Araújo MQ, Carvalhães RP, Faria SO, Marinho MF, Santos FM, Santos TGQA et al., Perfil de Resistência Bacteriana em Fômites de UTI em Hospital Público do Estado do Tocantins. *Revista Cereus*. 2017; 9(2): p.126-141.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews*. 2015;13(1): p.42-51.
- Lima CC, Benjamim SCC, Santos RFS. Bacterial resistance mechanism against drugs: a review mecanismo de resistencia bacteriana frente a los fármacos: una revisión. *Revista Cuidarte*. 2017; 11(1): p. 105-113.
- Cadot L, Bruguière H, Jumas-bilak E, Didelot MN, Masnou A, Barry G. et al., Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak reveals incubators as pathogen reservoir in neonatal care center. *European Journal of Pediatrics*. 2019; 178(4): p. 505-513.
- Bowen JR, Callander I, Richards R, Lindrea KB. Decreasing infection in neonatal intensive care units through quality improvement. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2017; 102(1): p. 51-57.
- Lima JLC, Alves LR, Paz JNP, Rabelo MA, Macie MAV, Moraes MMC. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2017; 29(3): 310-316.
- Leikin-Zach V, Shany E, Yitshak-Sade M, Eshel R, Shafat T, Borer A, et al. Neonatal Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in the Neonatal Intensive Care Unit. *Original Articles*. 2018; 5(20): p. 286-290.
- Almeida MVA, Cangussú IM, Carvalho ALS, Brito ILPB, Costa RA. Drug resistance, AmpC-β-lactamase and extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. *Revista do Instituto de Medicina de São Paulo*. 2017; 59.
- Andrade LSA, Carreiro LP, Bastos RPS, Pitanga, TN. Resistência de enterobactérias a Beta-Lactâmicos Mediada por Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Carbapenemases. *SEMOC*.2018.

Correspondência

Henrique Francisco de Almeida

Universidade Tiradentes

Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE,

CEP: 49032-490

E-mail: henriquealmeida16@hotmail.com

Avaliação dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência humana

Evaluation of rapid test parameters for the human immunodeficiency virus diagnosis

Renata Almeida Scherdien¹

Camila Lima da Silva¹

Allyne Cristina Grando²

Resumo

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise comparativa entre 13 diferentes TR (teste rápido) para HIV que possuem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os dados foram retirados das bulas fornecidas nos sítios eletrônicos dos fabricantes dos TR. **Métodos:** Neste trabalho comparou-se os TR em relação aos seus parâmetros como sensibilidade, especificidade, acurácia, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) e seus interferentes relatados em suas respectivas bulas. **Resultados:** Observou-se que somente um fabricante não foi condizente com os valores estipulados pelo Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais (DDAHV) que foi o ECO Teste com valores de sensibilidade e especificidade de 99,1% e 99,2%, respectivamente. **Conclusão:** Concluiu-se que os fabricantes Alere Determine, Bioclin, Bioeasy, Imunocrom, MedTeste e OnSite revelaram-se com as bulas mais completas, apresentando todos os parâmetros necessários para avaliação do desempenho dos TR em questão.

Palavras-chave

HIV; Diagnóstico; Sensibilidade; Especialidade

INTRODUÇÃO

O Departamento de Infecções Sexualmente Transmissíveis (DIST) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) do Ministério da Saúde (MS) vem trabalhando de modo contínuo na busca de uma solução ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e AIDS.⁽¹⁾ Baseado nisso, novas metodologias de diagnóstico têm sido adotadas com a intenção de proporcionar melhorias ao diagnóstico antecipado do HIV, conseqüentemente diminuindo o número de casos e transmissões.⁽²⁾

De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), mundialmente são cerca de 39,6 milhões de pessoas vivendo com HIV no ano de 2017.⁽³⁾ No Brasil atualmente existem cerca de 630 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS. No ano de 2018, surgiram 12.505 novos casos de homens infectados com o vírus HIV, 4.737 de mulheres e 119 crianças menores de cinco anos.⁽³⁾ O MS estima que há cerca de 255 mil brasileiros infectados pelo vírus que não sabem da sua condição, pois nunca realizaram testes laboratoriais para os devidos fins.⁽⁴⁾

Segundo o Boletim Epidemiológico de HIV/AIDS, de 2007 até junho de 2018 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 247.795 casos de infecção pelo HIV no Brasil. Na Região Sul fazem parte destes casos 42.215 pessoas, entre eles no Rio Grande do Sul foram 23.957 casos, caracterizando assim como o estado com a maior taxa de detecção do vírus na Região Sul. Porém a Região Sudeste é representada com o maior número de casos, com 50.890 pessoas com o HIV.⁽⁴⁾

No momento atual do nosso país, há várias dificuldades que estão associadas à implementação de novos testes mais específicos para detecção do vírus, desafios que visam detectar com precisão e acurácia uma boa amostra biológica que será utilizada para os testes de diagnóstico.⁽⁵⁾ Algumas dificuldades permanecem constantes, como o desenvolvimento progressivo da tecnologia que desperta de maneira periódica novas metodologias no mercado de testes, sua aprovação pelas agências reguladoras e ainda sua aceitação para uso na rotina diária do diagnóstico em diferentes situações e instalações.⁽⁶⁾

¹ Graduanda do curso de Biomedicina da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

² Professora Adjunta do curso de Biomedicina da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Instituição: Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Canoas, RS, Brasil.

Recebido em 25/05/2020

Aprovado em 08/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.202201997

Resultados falsos positivos (FP), falsos negativos (FN) ou indeterminados podem ser atingidos com a utilização de qualquer teste, seja devido à limitação da própria metodologia e do que ela pode detectar na amostra, ou seja, pela característica que o HIV tem do período de infecção nos indivíduos, até a produção de anticorpos consideráveis para serem detectados nos mesmos.⁽⁶⁾ A reação cruzada de anticorpos presentes na amostra por algumas doenças autoimunes, dentre outras situações, pode produzir resultados FP ou indeterminados em qualquer teste sorológico.⁽⁷⁾

Atualmente existem algumas metodologias para diagnosticar o HIV com uma ampla variação de testes de diferentes marcas no mercado, entre elas a imunocromatografia realizada através de testes rápidos (TR). Os TR são testes imunocromatográficos que podem ser executados em até 20 minutos.⁽⁶⁾ Existem vários formatos de TR, e os mais regularmente utilizados são as tiras de imunocromatografia de fluxo lateral, de dupla migração, dispositivos de imunocentralização e fase sólida.⁽⁶⁾

O TR consiste em ser estendido sobre uma membrana de nitrocelulose fixa sobre suporte plástico. À medida que a amostra testada é absorvida pelo papel de filtro, e flui ao longo da reação, os anticorpos específicos para HIV presentes na amostra interagem com um conjugado composto por anticorpo monoclonal Anti Imunoglobulina G (IgG) humana. Logo após, o complexo flui pela membrana e os anticorpos específicos para HIV-1 e HIV-2 reagem aos antígenos, formando a coloração na tira, determinando se o resultado é reagente para o HIV-1 e HIV-2.⁽⁶⁾

Tendo em vista que não existem pesquisas até o momento no Brasil comparando uma grande quantidade de diferentes marcas de TR para HIV, este trabalho teve

como objetivo comparar parâmetros como sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos e negativos com diferentes fabricantes de TR utilizados para detectar anticorpos do HIV no mercado laboratorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

A partir de dados coletados em bulas de TR para HIV, retiradas dos sites *web* dos fabricantes, foi realizada uma análise comparativa com o objetivo de determinar qual o teste mais sensível, específico, com maior valor de acurácia, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e interferentes. Foram selecionadas bulas de 13 testes imunológicos que possuem registro na ANVISA.

Realizou-se uma revisão bibliográfica dos últimos anos sobre testes rápidos para HIV para fundamentar o artigo. A revisão foi efetuada nas bibliotecas eletrônicas Scielo, PubMed e BVS, nos idiomas português, inglês e espanhol, utilizando os seguintes descritores: HIV, sintomas, transmissão, diagnóstico, epidemiologia, testes rápidos, sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN.

Por se tratar de uma revisão bibliográfica e os dados coletados das bulas dos testes não conterem informações pessoais sobre pacientes, não ocorreu a necessidade de encaminhamento para um Comitê de Ética e Pesquisa.

RESULTADOS

Foram analisados 13 testes imunocromatográficos para HIV. Seus parâmetros foram retirados de suas respectivas bulas fornecidas pelos sites *web* dos próprios fabricantes. Os dados coletados são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Comparação entre os parâmetros de testes imunocromatográficos

Testes/Parâmetros	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
ACTION - Orange Life	>99,9%	>99,9%	NI*	NI*	NI*
Alere Determine HIV	100%	99,9%	99,85%	100%	99,80%
Bioclin – HIV Tri Line	>99,9%	99,9%	99,82%	94,87%	100%
Biocon HIV	99,9%	99,6%	99,77%	99,28%	99,9%
Bioeasy HIV TEST	100%	99,8%	99,86%	99,9%	99,8%
Bio-Manguinhos TR – HIV	99,7%	100%	NI*	NI*	NI*
ECO Teste HIV	99,1%	99,2%	99,22%%	99,16%	99,28%
Imunocrom HIV	>99%	>99%	100%	99,9%	99,9%
Imuno-Rápido HIV	100%	99,9%	NI*	NI*	NI*
Labtest HIV	100%	100%	100%	100%	100%
MedTeste HIV	>99,9%	99,5%	99,6%	99,9%	99,5%
OnSite HIVAb Combo Plus	100%	100%	100%	99,9%	99,9%
VIKIA® HIV	99,59%	99,71%	NI*	NI*	NI*

Legenda*: NI – Não informado; VPP – Valor Preditivo Positivo; VPN – Valor Preditivo Negativo. Fonte: Autoral

Tabela 2 – Substâncias interferentes nas amostras referidas pelos testes imunocromatográficos

Teste Rápido	Interferentes na amostra
1. ACTION - Orange Life	Anticoagulantes como heparina, EDTA e citrato não afetam o resultado. Interferentes relevantes conhecidos como amostras hemolíticas, fator reumatoide, amostras ictericas, hemolisadas e lipêmicas podem prejudicar os resultados do teste. Os resultados falsos positivos podem aparecer em imunoenaios sensíveis devido à presença de anticorpos heterofílicos com antmouse humanos ou proteínas de ligação inespecíficas.
2. Alere Determine HIV	Os 10 agentes patogênicos causadores de reação cruzada listados abaixo não tiveram efeito nos resultados do teste HIV: Hepatite C, Vírus Linfotrópico da célula humana, Epstein Barr, Hepatite B, Citomegalovírus, Clamídia, Influenza, Toxoplasma, Sífilis, <i>Tripanossoma cruzi</i> ; Nove substâncias potenciais não tiveram efeito no desempenho: Mulheres grávidas, colesterol alto, bilirrubina alta, fator reumatoide, amostras lipêmicas, hemolisadas, autoimune, cirrose alcoólica, gravidez múltiparas. Não houve interferência com 25 fármacos, todos testados com concentração de 250µg/mL, sendo alguns deles: abacavir, paracetamol, ácido acetilsalicílico, amoxicilina, aspirina, diclofenaco, ácido fólico, ibuprofeno, ferro, metformina, pirazinamida, ritonavir.
3. HIV Tri Line – Bioclin	Hemólise com valores de hemoglobina até 10g/L não interferem na detecção. Não foram encontradas interferências significativas até 30g/L de lípidos, 0,2g/L de bilirrubina e 60g/L de proteínas. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada com as seguintes infecções testadas: Hepatite C, Hepatite B e Sífilis.
4. HIV Biocon	NI*
5. HIV TEST Bioeasy	Anticoagulantes, como heparina, EDTA e citrato de sódio, não afetam o resultado do teste. As utilizações de amostras hemolíticas, lipídicas, ictericas, contendo fatores reumatoides, podem afetar o resultado do teste.
6. TR – HIV Bio-Manguinhos	Resultados falsos negativos podem ser obtidos caso o teste seja utilizado em amostras de pacientes soropositivos, que estejam ou tenham sido submetidos à terapia antirretroviral.
7. ECO Teste HIV	NI*
8. Imunocrom HIV	A reação cruzada foi acessada testando soros de pacientes acometidos com outras infecções e negativos para HIV. Todos os resultados obtidos foram negativos, reduzindo, assim, a possibilidade de reação cruzada com as seguintes infecções: Hepatite B e C; Vírus linfotrópico da célula T humana; Chagas; Sífilis e Toxoplasmose. Amostras contendo altos títulos de anticorpos heterofílicos ou fator reumatoide além de anticorpos monoclonais, podem interferir nos resultados.
9. Imuno-Rápido HIV	Usar soros livres de hemólise, lipemia e contaminação. Recomenda-se usar amostras frescas. Amostra diluída pode ocasionar resultado falso negativo. Amostras de sangue total coletadas com anticoagulante líquido podem ocasionar falsos resultados. A avaliação para infecção por HIV em pacientes de hemodiálise crônicos requer sempre testes confirmatórios, devido aos interferentes presentes nesse tipo de amostra. Podem ocorrer resultados falsos positivos e falsos negativos com este teste, cuja proporção dependerá da prevalência da doença na população ensaiada.
10. Labtest HIV	Não foram observados resultados falsamente positivos em amostras positivas para Vírus linfotrópico da célula T humana, Hepatite C e B, <i>Tripanossoma cruzi</i> , Sífilis.
11. MedTeste HIV	Não mostrou reações cruzadas com amostras reagentes de Hepatites A, B e C, Sífilis, Citomegalovírus, Rubéola, Toxoplasmose. Algumas reações cruzadas foram observadas em amostras reagentes de Fator Reumatoide, Epstein Barr e Hepatite B aguda. Nenhuma das substâncias nas concentrações testadas, como acetaminofeno 20mg/dL; ácido acetilsalicílico 20mg/dL; ácido ascórbico 2g/dL; creatina 200mg/dL; bilirrubina 1g/dL; cafeína 20mg/dL; ácido gentísico 20mg/dL; albumina 2g/dL; hemoglobina 1,1g/dL e ácido oxálico 600mg/dL, interferiu no ensaio.
12. OnSite HIVAb Combo Plus	Não foi observado resultado FP nos seguintes estados patológicos como: Hepatite B, Hepatite A, Hepatite C, Dengue, Sífilis, Tuberculose. Substâncias comuns (como medicações para dor e febre) podem afetar o desempenho. As substâncias nas concentrações testadas não afetaram a performance do teste, tais como: Bilirrubina 20mg/dL; creatinina 442µmol/L; glicose 55 mmol/L; albumina 60g/L; ácido salicílico 4,34mmol/L; heparina 3,000U/L; EDTA 3,4µmol/L. Algumas amostras contendo elevados títulos de anticorpos heterofílicos ou fator reumatoide podem ocasionar resultados FP.
13. VIKIA® HIV	Não houve interferência e influência significativa de hemólise até 5g/L; lipemia até 30mg/mL; bilirrubinemia até 300mg/mL, biotina até 20 µg/mL.

Legenda *: NI – Não Informado Fonte: Autoral

Os testes em sua totalidade apresentaram valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN superiores a 99% sendo que cinco destes testes, tais como Alere Determine,⁽⁸⁾ Bioeasy,⁽⁹⁾ Imuno Rápido,⁽¹⁰⁾ Labtest,⁽¹¹⁾ OnSite,⁽¹²⁾ apresentaram sensibilidade de 100%. As marcas Labtest⁽¹¹⁾ e OnSite⁽¹²⁾ apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%. Em comparação, o fabricante EcoTeste⁽¹³⁾ apresentou os menores parâmetros em relação aos demais

testes, com valores de sensibilidade e especificidade 99,1%, 99,2% respectivamente.

Os testes Imunocrom HIV,⁽¹⁴⁾ Labtest⁽¹¹⁾ e OnSite HIV⁽¹²⁾ apresentaram valores de acurácia, VPP e VPN acima de 99,9%. O teste EcoTeste⁽¹³⁾ mostrou-se com o menor valor de acurácia de 99,22%; em consequência VPP e VPN com valores de 99,16% e 99,28% respectivamente. Quatro testes, sendo estes ACTION – Orange Life,⁽¹⁵⁾ Bio-Manguinhos TR

HIV,⁽¹⁶⁾ Imuno Rápido,⁽¹⁰⁾ Vikia HIV,⁽¹⁷⁾ não apresentaram os dados necessários para calcular os valores de acurácia, VPP e VPN, tendo em vista que para tal feito as bulas devem referir quantas amostras foram testadas para avaliar o desempenho do teste e quais os resultados FP, FN, VP e VN.

Relacionado aos interferentes de cada teste, dois fabricantes, Biocon HIV⁽¹⁸⁾ e EcoTeste HIV⁽¹³⁾ não apresentaram seus interferentes em suas bulas. Os testes Bioclin,⁽¹⁹⁾ MedTeste,⁽²⁰⁾ OnSite⁽¹²⁾ e Vikia⁽¹⁷⁾ foram os únicos a apresentar algumas substâncias de alto potencial interferente e com concentrações testadas que podem alterar o desempenho do teste, tais como bilirrubina, creatinina, glicose, proteínas, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido oxálico, heparina, EDTA, biotina e lipídios. Com a exceção dos testes Bio-Manguinhos,⁽¹⁶⁾ Imunocrom⁽¹⁴⁾ e Labtest,⁽¹¹⁾ que não mencionaram nenhuma destas substâncias como possíveis interferentes.

Os testes Action Orange Life⁽¹⁵⁾ e Bioeasy⁽⁹⁾ relatam que ao utilizar amostras com anticoagulantes como heparina, EDTA e citrato, estas substâncias não interferem no resultado obtido. Em contrapartida, o teste Imuno Rápido⁽¹⁰⁾ diz que amostras de sangue total colhidas com anticoagulantes podem ocasionar falsos resultados, não especificando se são resultados FP ou FN.

Seis testes, Alere Determine,⁽⁸⁾ Bioclin,⁽¹⁹⁾ Imunocrom,⁽¹⁴⁾ Labtest,⁽¹¹⁾ MedTeste⁽²⁰⁾ e OnSite⁽¹²⁾ abordaram sobre possíveis reações cruzadas com as seguintes infecções: hepatites A, B e C, sífilis, citomegalovírus, rubéola e toxoplasmose.

Os fabricantes Action Orange Life,⁽¹⁵⁾ Bioeasy,⁽⁹⁾ Imunocrom,⁽¹⁴⁾ MedTeste⁽²⁰⁾ e OnSite⁽¹²⁾ relatam possíveis resultados FP em amostras contendo uma alta titulação de fator reumatoide, sendo que Action,⁽¹⁵⁾ Imunocrom⁽¹⁴⁾ e OnSite⁽¹²⁾ relatam ainda reação cruzada com anticorpos heterofílicos resultando em possíveis FP. O fabricante Alere Determine⁽⁸⁾ foi o único a abordar sobre possíveis interferentes, como gestantes, gravidez múltipla e cirrose alcoólica, conjuntamente com alguns fármacos testados em concentrações de 250µ/mL, tais como abacavir, paracetamol, ácido acetilsalicílico, amoxicilina, aspirina, diclofenaco, ácido fólico, ibuprofeno, ferro, metformina, pirazinamida, ritonavir. Portanto, estas substâncias não interferiram no ensaio do teste.

Não foi possível identificar um interferente comum entre todos os testes.

DISCUSSÃO

Em 2005, a Portaria n.º 34/05 estabeleceu a regulamentação do uso dos TR anti-HIV com o objetivo de ampliar o acesso ao diagnóstico da infecção pelo HIV, tendo como justificativa que se conhecendo a condição sorológica do paciente e a identificação precoce da doença irá contribuir para a diminuição no número de transmissões.⁽²¹⁾

Atualmente, os TR são muito utilizados devido às suas vantagens, como baixo custo, rapidez e fácil utilização.⁽²²⁾ Porém, alguns estudos mostram que devido à sensibilidade e especificidade menor, durante a janela imunológica da infecção podem ocorrer mais resultados FN, constatando os casos positivos em apenas 91% das vezes.^(23,24)

De acordo com o MS, os TR foram inicialmente desenvolvidos no final da década de 1980, mas alcançaram mais notoriedade nos anos 1990. Com o decorrer do tempo e com os avanços tecnológicos para detectar o HIV, o TR mostrou-se tão acurado quanto os métodos do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).⁽²⁵⁾ Por ser um teste simples e rápido, pode ser considerado de grande valia para ampliar o diagnóstico em regiões com pouca infraestrutura, não havendo a necessidade de materiais caros e complexos.⁽²⁶⁾ Existem no mercado variados kits de TR disponíveis, que empregam diferentes princípios técnicos e que são comercializados por vários fabricantes.⁽²⁷⁾

Dentro deste contexto, se faz necessária a ação de analisar os parâmetros de um TR, para que tenhamos entendimento de quão eficaz é o desempenho de determinado teste, ou seja, facilitam observar se ele realmente condiz com o que lhe foi proposto. Para avaliar estes parâmetros, é de suma importância ter o amplo e necessário conhecimento dos mesmos, ficando a cargo do laboratório ou do profissional que estiver utilizando avaliar e definir qual teste será específico para a finalidade escolhida.⁽²⁸⁾

O MS considera como TR com um bom desempenho aqueles que possuem sensibilidade maior ou igual a 99,5% e especificidade maior ou igual a 99,0%.⁽⁶⁾ A sensibilidade de um teste diagnóstico é a capacidade de identificar os verdadeiros positivos nos indivíduos verdadeiramente doentes. Já a especificidade é a capacidade de um teste diagnóstico de identificar os verdadeiros negativos em pacientes realmente sadios.⁽²⁹⁾

Comparando os parâmetros entre os testes selecionados, eles apresentaram todos os valores de sensibilidade e especificidade superiores a 99%. Somente um teste não se ajusta de acordo com os parâmetros requeridos pelo MS, pois apontou sensibilidade menor que 99,5%, que fora a marca EcoTeste HIV⁽¹⁴⁾ com 99,1%, da mesma forma a menor especificidade com valor de 99,2%.

Em estudo realizado no Peru,⁽³⁰⁾ para comparar a sensibilidade de três marcas de TR, sendo elas Alere Determine, Bioline e OnSite, verificou-se que os valores referidos nas bulas dadas pelos fabricantes não condizem com o teste feito pelos autores, visto que os três testes determinaram sensibilidade de 100% e no estudo realizado constataram valores diferentes de sensibilidade, respectivamente como 54,8% 47,6% e 14,3%. Como justificativa, os autores consideraram que os testes feitos para verificar o desempenho de cada teste fora precedente de outros países, e que

uma das razões por terem dado resultados tão diferentes de sensibilidade seria a variabilidade antigênica do HIV.⁽³⁰⁾

Os fabricantes Bio-Manguinhos⁽¹⁶⁾ e Vikia⁽¹⁷⁾ apresentaram uma especificidade de 100% e 99,71%, respectivamente, ou seja, a especificidade foi maior que a sensibilidade, que apresentou valores de 99,7% e 99,59%, respectivamente. Estudos mostram que geralmente os TR são mais sensíveis do que específicos, e que para se confirmar se uma amostra realmente é reagente para HIV deve-se realizar testes mais específicos, como Western blot, por exemplo.⁽⁶⁾ Testes mais sensíveis conseguem detectar com mais facilidade um anticorpo em uma fase mais aguda da doença. Porém, em um âmbito laboratorial clínico precisa-se ter uma especificidade maior, assim diminuindo os resultados FN.⁽⁹⁾

Um estudo realizado em 2011 avaliou um novo teste imunocromatográfico produzido pela empresa Canadense Medmira para a detecção de anticorpos específicos de HIV, HCV e HBV. Foram colhidas amostras com resultados reagentes e não reagentes para a presença de anticorpos anti-HIV para avaliar o desempenho separadamente em cada infecção. Os resultados encontrados se mostraram bastante favoráveis em relação ao teste para HIV com valores de sensibilidade, especificidade e acurácia, revelando 98,6%, 100% e 99,3%, respectivamente. Os autores também investigaram a presença de anticorpos específicos de algumas infecções importantes, além do fator reumatoide, utilizando amostras reagentes para eles, de modo a avaliar se podem causar reações cruzadas, ocasionando, assim, resultados FP e FN no teste. Os autores concluíram que para o *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, citomegalovírus, rubéola, herpes virus-1, *Treponema pallidum* e fator reumatoide não foram observadas reações cruzadas.⁽³¹⁾

Os fabricantes Alere Determine,⁽⁸⁾ Bioclin,⁽¹⁹⁾ Imunocrom,⁽¹⁴⁾ LabTest,⁽¹¹⁾ MedTeste⁽²⁰⁾ e OnSite⁽¹²⁾ relataram sobre possíveis reação cruzadas com as mesmas infecções referidas no estudo citado anteriormente, porém estes não causaram interferência no desempenho do teste. Cinco dos testes, Action Orange Life,⁽¹⁵⁾ Bioeasy,⁽⁹⁾ Imunocrom,⁽¹⁴⁾ MedTeste⁽²⁰⁾ e OnSite,⁽¹²⁾ apresentaram possíveis interferências no ensaio devido à utilização de amostras com titulação elevada de fator reumatoide.

A marca LabTest HIV⁽¹¹⁾ foi a única a apresentar todos os parâmetros de 100% e tampouco referiu sobre interferentes que pudessem ocasionar um resultado FN, apenas FP. Nenhum teste dispõe de uma sensibilidade e especificidade de 100%, visto que o aumento da especificidade vem associado de uma queda da sensibilidade, e do mesmo modo o aumento da sensibilidade acompanha uma diminuição da especificidade. Daí ser muito difícil, na prática clínica, encontrar um teste diagnóstico que tenha valores de sensibilidade e especificidade de 100%, visto que os dois parâmetros são contrários entre si.⁽³²⁾

Resultados FN, FP, indeterminados ou divergentes podem ocorrer durante a rotina laboratorial, assim diminuindo o desempenho do teste.⁽²⁹⁾ Estes testes são simples de serem realizados, pois geralmente são utilizados antígenos virais fixados em um suporte sólido (membranas de celulose, por exemplo) para reagirem com os anticorpos da amostra e são acondicionados em embalagens individualizadas, permitindo a testagem individual de cada amostra.⁽²⁵⁾ Por essa razão, muitas vezes podem não estar armazenados corretamente com a temperatura recomendada pelo fabricante, ou então é utilizado um volume de amostra insuficiente, entre outras interferências, ocasionando os resultados descritos anteriormente.⁽³³⁾

Um estudo de 2014 avaliou a acurácia dos TR Bio-Manguinhos e Rapid Check utilizados em gestantes para o diagnóstico da infecção pelo HIV. O TR Bio-Manguinhos foi utilizado para a primeira testagem e o Rapid Check para a segunda, ou seja, o Rapid Check foi adotado como TR confirmatório, conforme estabelece o fluxograma de TR do DDAHV. Das 764 gestantes testadas, 10 pacientes apresentaram resultados positivos com o primeiro TR (Bio-Manguinhos) e após realizar o TR confirmatório (Rapid Check), dois pacientes revelaram resultados negativos. Estes dois resultados foram avaliados, portanto, como resultados inconclusivos, conseqüentemente necessitaram ser confirmados com ensaios complementares como Western Blot. Os oito testes restantes foram confirmados reagentes como Rapid Check, ou seja, comprovando o primeiro resultado realizado como Bio-Manguinhos. Os dois TR avaliados mostraram uma concordância de 99%, e os autores concluíram que os TR são uma ótima opção para maternidades que precisam investigar HIV em gestantes, porém deve-se utilizar dois TR para maior segurança.⁽³⁴⁾

Normalmente, o aumento da prevalência da infecção nos indivíduos reforça a probabilidade de que o indivíduo com resultado positivo esteja realmente infectado.⁽³⁵⁾ Em consequência, um único TR não possibilita o diagnóstico da infecção pelo HIV no Brasil.^(35,36) Conforme o fluxograma descrito na Portaria SVS/MS n.º 29, de 17 de dezembro de 2013, o MS recomenda que sejam utilizados dois TR em sequência caso a amostra seja positiva para a testagem do primeiro TR utilizado.⁽⁶⁾

Verifica-se que os fabricantes Action Orange Life,⁽¹⁵⁾ Bio-Manguinhos,⁽¹⁶⁾ Imuno Rápido⁽¹⁰⁾ e Vikia⁽¹⁷⁾ não referiram valores de acurácia, VPP e VPN. A acurácia de um marcador sorológico tem relação com a amplitude com que ele pode prognosticar a ocorrência de determinada doença ou infecção.⁽³⁷⁾ Nesse contexto, temos uma probabilidade de o indivíduo estar realmente doente ou não, isto é conhecido como Valor Preditivo (VP), que pode ser positivo (VPP) ou negativo (VPN). Conseqüentemente, o VPP é a proporção de VP e representa a probabilidade de um indivíduo com o teste positivo ter a doença. E o VPN é a proporção de VN

e representa a probabilidade de um indivíduo com o teste negativo não ter a doença. Uma vez que são parâmetros importantes e necessários para determinar a eficácia de um teste, ou seja, diz respeito à dimensão com que ele pode prever a ocorrência da doença, devem ser apresentados nas bulas.⁽³⁸⁾

A prevalência da doença na população em certo local determina um VPP e VPN.⁽³⁹⁾ Em locais de baixa prevalência da infecção pelo HIV, por exemplo, o VPP pode não ser suficientemente alto.⁽³⁶⁾ Logo, se a prevalência do HIV for alta em um local, o VPP aumenta e o VPN diminui. Assim, eles serão diferentes em populações com maior ou menor prevalência da doença em comparação com a população na qual o teste foi descrito pela primeira vez. Portanto, valores preditivos não são características fixas do teste e não podem ser generalizados para populações com diferentes prevalências da doença.⁽³⁹⁾

Os fabricantes Biocon⁽¹⁸⁾ e EcoTeste⁽¹³⁾ não apresentaram os interferentes em suas bulas, tendo em vista a importância dos mesmos para verificar se pode haver resultados FP e FN, dependendo do tipo de amostra e do paciente. Seus valores de sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 100% e 99,75%, 99,9% e 99,6%, 99,1% e 99,2%. Apesar de seus valores de sensibilidade e especificidade, resultados FP e FN podem ser causados pelas reações cruzadas e interferências na amostra. Quando o analito apresenta concentrações muito elevadas, é possível ultrapassar a capacidade de ligação dos anticorpos, ocorrendo assim os resultados descritos anteriormente. Amostras muito diluídas ou hemolisadas, presença de substâncias que interferem na reação antígeno-anticorpo do mesmo modo podem apresentar resultados FP e FN, e conseqüentemente podemos observar a importância relacionada ao se ter conhecimento sobre os interferentes.⁽⁴⁰⁾

Como se pode observar, cada um dos testes expressa diferentes substâncias em diferentes concentrações testadas, como bilirrubina, creatinina, glicose, proteínas, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido oxálico, heparina, EDTA, biotina e lipídios, porém nem todos apresentam as mesmas substâncias. Os demais testes expressaram algumas destas substâncias como interferentes, mas não apresentaram suas concentrações testadas. Os fabricantes HIV Tri Line Bioclin⁽¹⁹⁾, Imunocrom⁽¹⁴⁾ e MedTeste⁽²⁰⁾ relatam que não houve reações cruzadas gerando resultados FP e FN. Portanto, não foi possível observar um interferente comum em todos os testes, visto que alguns comentam sobre as mesmas substâncias, mas em concentrações diferentes.

Um estudo realizado com pacientes africanos em 2010 mostrou que a doença de Chagas interfere significativamente nos desempenhos de TR para HIV. Os testes avaliados apresentaram resultados de 100% de especificidade testados em pacientes sem anticorpos para o *Trypanosoma brucei gambiense*. Os valores de especificidade dos mesmos TR

diminuíram consideravelmente em pacientes que tinham anticorpos reagentes para a infecção, antes do tratamento. Foram encontrados valores de 39,1% para o TR Determine, 85,3% a 92,8% para Vikia, Immuno Flow, Double Check e Bioline. A infecção pelo *Trypanosoma brucei gambiense* diminui as especificidades dos TR para o diagnóstico do HIV.⁽⁴¹⁾

O fabricante Alere Determine⁽⁸⁾ foi o único teste a abordar sobre interferentes específicos, que os outros testes não comentaram, tais como gravidez múltipla, gestantes, cirrose alcoólica e colesterol elevado. Do mesmo modo, relatou sobre fármacos que podem causar interferência, alguns bastante utilizados pela população, como: paracetamol, amoxicilina, aspirina, diclofenaco, ibuprofeno, ácido fólico e metformina. O teste OnSite⁽¹²⁾ aborda sobre medicamentos para dor e febre como possíveis interferentes no desempenho do teste, mas não cita quais medicamentos. Os medicamentos são interferentes relevantes, tendo em vista sua ampla utilização pela população. Seja qual for o fármaco, independentemente da via de administração, pode interferir nos testes laboratoriais. Como exemplo, se tem a conversão da droga em outros compostos iônicos ou mais polares por biotransformação hepática, transformações como estas podem produzir derivados e metabólitos que reagem no ensaio, resultando em resultados incorretos.⁽⁴²⁾

CONCLUSÕES

Avaliando os diferentes fabricantes de TR para HIV analisados neste estudo, observa-se que cerca de todos os TR apresentaram em suas bulas valores de sensibilidade e especificidade de acordo com o que o MS estipula, ficando evidente que apenas a marca EcoTeste⁽¹³⁾ não está em consonância com estes parâmetros por estar abaixo do que é recomendado pelo órgão regulamentador dos testes em nosso país. Os demais fabricantes que apresentaram todos os parâmetros analisados em suas bulas revelaram parâmetros com valores muito similares entre si.

Ademais, é importante considerar que o MS não estipula valores de VPP, VPN e acurácia, em razão de que estes parâmetros são variáveis porque dependem da prevalência daquela doença/infecção de determinada região em que foi feito o desempenho do teste. Verificou-se que de 13 testes analisados neste estudo, quatro não apresentaram os parâmetros relacionados à VPP, VPN e acurácia.

Por fim, no presente trabalho houve a comparação dos TR de diferentes fabricantes em relação aos seus parâmetros de desempenho e concluiu-se que os fabricantes Alere Determine,⁽⁸⁾ Bioclin,⁽¹⁹⁾ Bioeasy,⁽⁹⁾ Imunocrom,⁽¹⁴⁾ MedTeste⁽²⁰⁾ e OnSite⁽¹²⁾ foram os testes com as bulas mais completas, apresentando elevados valores de sensibilidade e especificidade e, do mesmo modo, contendo todos os parâmetros necessários para analisar o desempenho do teste juntamente com seus principais interferentes nas amostras.

Abstract

Objective: The objective of this work was to carry out a comparative analysis between 13 different RT (rapid test) for HIV that are registered with the National Health Surveillance Agency (Anvisa). The data were taken from the package inserts provided on the websites of the manufacturers of the RT. Methods: In this work, the RT in relation to your parameters such as sensitivity, specificity, accuracy, Positive Predictive Value (PPV) and Negative Predictive Value (NPV) and their interferences reported in their respective package inserts was compared. Results: We conclude that only one manufacturer does not comply with the values stipulated by the DDAHV that was the ECO Test with values of sensitivity and specificity of 99,1% and 99,2% respectively. Conclusion: The manufacturers Alere Determine, Bioclin, Bioeasy, Immunocrom, MedTest and OnSite have revealed themselves with the most complete package inserts presenting all the necessary parameters to evaluate the performance of the RT in question.

Keywords

HIV; Diagnosis; Sensitivity; Specificity

REFERÊNCIAS

- Schmitt JHL, Silva RM. Prevalência de sintomas depressivos em pacientes portadores do HIV/Aids em um hospital de referência na cidade de Florianópolis – SC. *Arq Catarinenses Med.* 2009 Abr-Jul;38(2):90-97.
- Santos AFM, Assis M. Vulnerabilidade das idosas ao HIV/AIDS: despertar das políticas públicas e profissionais de saúde no contexto da atenção integral: revisão de literatura. *Rev Bras Geriatr Gerontol* [periódicos na internet]. 2011 [acesso em 15 de nov 2018];14(1). Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbger/v14n1/a15v14n1.pdf>
- UNAIDS [homepage na internet]. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS [acesso em 15 de nov 2018]. Disponível em: <https://unaids.org.br>.
- Ministério da Saúde (BR). Boletim epidemiológico HIV/AIDS 2018. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2018.
- Knottnerus JA, Buntinx F. The evidence base of clinical diagnosis: theory and methods of diagnostic research. 2. ed. Oxford: BJM Books; 2011.
- Ministério da Saúde (BR). Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de vigilância, prevenção e controle das infecções sexualmente transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatite Vírais; 2018.
- Ministério da Saúde (BR); Universidade Federal de Santa Catarina. Diagnóstico do HIV. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, AIDS e Hepatites Vírais; 2014.
- Alere Determine. [Bula]. São Paulo (SP): Alere Medical Co; 2015.
- Bioeasytest HIV. [Bula]. República Popular da China: AconBiotech; 2019.
- Imuno-Rápido HIV. [Bula]. São Carlos (SP): WAMA Diagnóstica; 2019.
- Labtest. [Bula]. Lagoa Santa (MG): Labtest Diagnóstica S.A; 2012.
- OnSite. [Bula]. São Paulo (SP): BioAdvance Diagnósticos Ltda; 2017.
- ECO Teste. [Bula]. Corinto (MG): Eco Diagnóstico Ltda – ME; 2017.
- Imunocrom. [Bula]. Contagem (MG): Mbiolog Diagnósticos; 2017.
- Action-OrangeLife. [Bula]. Rio de Janeiro (RJ): Orangelife Com. e Ind. Ltda; 2017.
- Bio-Manguinhos. [Bula]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2007.
- VIKIA. [Bula]. São Paulo (SP): bioMérieux Ltda; 2017.
- Biocon. [Bula]. Belo Horizonte (MG): Diagnóstica – Importadora e Distribuidora Ltda – ME; 2010.
- Bioclin. [Bula]. Belo Horizonte (MG): Quibasa Química Básica Ltda; 2019.
- Medteste. [Bula]. Serra (ES): MedLevensohn Com. e Rep. de Prod. Hospitalares Ltda; 2018.
- Silva O, Tavares LHL, Paz LC. As atuações do enfermeiro relacionadas ao teste rápido anti-HIV diagnóstico: uma reflexão de interesse da enfermagem e da saúde pública. *Rev Enfermagem em Foco* [periódicos na internet]. 2011 [acesso em 26 de mai 2019];2(Suppl). Disponível em: <http://revista.cofen.gov.br/index.php/enfermagem/article/view/83/69>
- Martínez-Oliva BG, Montaña-Valenzuela KJ, Rodríguez-Herbas P, Flores-León AA, Grados-Torrez RE. Sensibilidad y especificidad de pruebas inmunocromatográficas utilizadas en el nuevo algoritmo de diagnóstico de VIH en Bolivia. *Gac Med Bol.* 2018;41(2):6-8.
- Branson BM, MD. The future of HIV testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* [periódicos na internet]. 2010 dez [acesso em 26 de mai 2019];55(Suppl 2). Disponível em: https://journals.lww.com/jaids/fulltext/2010/12152/the_future_of_hiv_testing.11.aspx
- Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, Dragavon J, Thomas KK, Brennan CA, et al. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis.* 2009 Ago;49(3):444-53.
- Ministério da Saúde (BR). Testes rápidos: considerações gerais para seu uso com ênfase na indicação de terapia anti-retroviral em situações de emergência. Brasil: Unidade de assistência, unidade de laboratório e rede de direitos humanos da coordenação nacional de DST/Aids; 1999.
- Cruz HM. Avaliação do desempenho de testes rápidos na detecção de marcadores do vírus da hepatite B. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Fundação Oswaldo Cruz; 2014.
- Moreschi LB, Beltrame M, Soares RG, Dockhorn DMC, Neves M. Testes rápidos para diagnóstico de HIV: uma revisão narrativa da literatura. *Revista Eletrônica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul* [periódicos na internet]. 2015 [acesso em 26 de mai 2019];8(1). Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/20730/12994>
- Sead C. Princípios Básicos de Imunologia. 2. ed. Canoas: Editora da ULBRA; 2014.
- Oliveira GM, Camargo FT, Gonçalves EC, Duarte CVN, Guimarães CA. TCBC-RJ. Revisão sistemática da acurácia dos testes diagnósticos: uma revisão narrativa. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37(2):153-6.
- Miranda-Ulloa E, Romero-Ruiz S, Briceño-Espinoza R, Santos-Anaya D. Evaluación de tres marcas comerciales de pruebas rápidas para la detección de VIH [carta]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2015;32(2):404-5.
- Souza IO. Validação de ensaio imunocromatográfico para a detecção múltipla de anticorpos específicos contra HIV, HBV e HCV. Salvador. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia] – Universidade Federal da Bahia; 2011.
- Bastos RR, Bastos RR. Sensibilidade e especificidade. *Revista Médica Oficial do Hospital Universitário da UFJF* [periódicos na internet]. 2004 Jan-Abr [acesso em 01 de jun 2019];30(1). Disponível em: http://www.ufff.br/hurevista/files/2016/11/extracted_Ensino_Pesquisa_2016_11_10_17_51_32_838.pdf
- Ferreira Junior OC, Ferreira C, Riedel M, Widolin MRV, Barbosa-Júnior A. HIV Rapid Test Study Group. Evaluation of rapid tests for anti-HIV detection in Brazil. *AIDS.* 2005 Out;19(Suppl 4):S70-5.
- Santos AM, Barbosa AB, Rocha TJM, Pimentel EC, Rodrigues MML. Avaliação de teste rápido para HIV, padronizado pelo Ministério da Saúde, utilizado em uma maternidade escola em Maceió-AL. *Revista Eletrônica de Farmácia* [periódicos na internet]. 2014 [acesso em 01 de jun 2019];11(3). Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/27822/17122>
- Patino CM, Ferreira JC. Entendendo os testes diagnósticos: parte 2. *J Bras Pneumol.* 2017;43(6):408.

36. Ministério da Saúde (BR). Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde – Programa Nacional de DST e Aids; 2008.
37. Ministério da Saúde (BR). HIV: estratégias para utilização de testes rápidos no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais; 2010.
38. Monico JFG, Dal Póz AP, Galo M, Santos MC, Oliveira LC. Acurácia e precisão: revendo os conceitos de forma acurada. Bol Ciênc Geod sec Comunicações Curitiba [periódicos na internet]. 2009 Jul-Set [acesso em 26 de mai 2019];15(3). Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/bcg/article/view/15513/10363>.
39. Kawamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. Arq Bras Cardiol. 2002 Out;79(4):437-41.
40. Barros E, Dora JM, Xavier RM. Laboratório na Prática Clínica – Consulta Rápida. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2016.
41. Lejon V, Ngoyi DM, Ilunga M, Beelaert G, Maes I, Büscher P, et al. Low specificities of HIV diagnostic tests caused by *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. J Clin Microbiol. 2010 Ago;48(8):2836-9.
42. Barros E, Barros HMT. Medicamentos na Prática Clínica. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Correspondência

Renata Almeida Scherdien
Universidade Luterana do Brasil

Av. Farroupilha, 8001 - São José, Canoas - RS, 92425-020

Hipossuficiência de vitamina D em pacientes atendidos em um laboratório de análises clínicas de Salvador, Bahia

Vitamin D hypo-sufficiency in patients attended in a clinical analysis laboratory in Salvador city, Bahia

Lara Rodrigues Santos de Novais¹

Kamilla Freire de Oliveira¹

Amanda Reis Silva²

Marcus Vinicius Alves Lima³

Resumo

Objetivo: Avaliar a frequência de hipossuficiência em vitamina D em soteropolitanos atendidos em um laboratório de análises clínicas de Salvador entre os anos de 2015 e 2018. **Métodos:** Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo, com amostra de conveniência. Foram prospectados dados sobre a dosagem de 25-hidróxi-vitamina D (OH25) de pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism a partir da estratificação por níveis séricos de vitamina D, gênero, faixa etária e procedência do paciente. Os valores de referência utilizados na análise da vitamina D estão em consonância com as recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia. **Resultados:** Foram analisados 2.263 pacientes com idade entre 1 e 99 anos (mediana = 53; IQ= 35 e 64), sendo 82,39% do sexo feminino. Dentre as 1.863 mulheres analisadas, 602 (32,31%) desvelaram níveis deficientes e 731 (39,24%) insuficientes. Entre os homens, 105 (26,38%) foram categorizados como deficientes e 150 (37,69%) insuficientes. Crianças menores de 12 anos exibiram os maiores níveis de vitamina D (mediana = 32,69) e adultos com mais de 80 anos apresentaram os menores níveis (mediana = 20,95). Todos os grupos etários evidenciaram mais de 40% dos indivíduos com hipossuficiência em vitamina D. **Conclusão:** Os resultados deste trabalho ratificam um percentual elevado de hipovitaminose D em todas as faixas etárias, suscitando necessidade de reflexão pelos órgãos competentes sobre o ajuste dos valores de referência ou suplementação de vitamina D na população.

Palavras-chave

Vitamina D; Deficiência; Análises Clínicas

INTRODUÇÃO

A vitamina D é um hormônio esteroide que atua principalmente na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, através da sua interação com as paratireoides, os rins e o intestino. Pode ser encontrada em duas formas: como ergocalciferol (vitamina D₂), produzida pelas plantas, e como colecalciferol (vitamina D₃), produzida no tecido animal pela ação da luz ultravioleta no 7-deidrocolesterol na pele humana.⁽¹⁾ Estima-se que 90% a 95% da vitamina D corpórea seja adquirida pela síntese cutânea, sendo o percentual adicional pela ingestão de

alimentos. Durante a exposição solar, o 7-deidrocolesterol absorve a radiação UVB, sendo convertido em pré-vitamina D₃. Uma vez formada, a pré-vitamina D₃, sob indução térmica, forma homodímeros em aproximadamente 24 horas, transformando-se em vitamina D₃.⁽²⁾ Assim como a forma absorvida no intestino delgado a partir da ingestão alimentar, esta vitamina D₃ é mobilizada até o fígado, onde ocorre a metabolização em calcidiol no retículo endoplasmático das células hepáticas, e depois em calcitriol, forma ativa da vitamina, nos túbulos contorcidos proximais. Este último processo também pode ocorrer em outros sítios anatómicos, como próstata, mama e cólon.⁽²⁾

¹ Graduada em Biomedicina pela Universidade Salvador (UNIFACS).

² Graduada em Farmácia pela Universidade Salvador (UNIFACS).

³ Mestre em Medicina Investigativa (IGM/FIOCRUZ).

Instituição: Universidade Salvador (UNIFACS). Salvador - BA, Brasil.

Recebido em 06/08/2020

Aprovado em 21/08/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202202054

A principal função da vitamina D consiste no aumento da absorção intestinal de cálcio, participando da estimulação do transporte ativo desse íon nos enterócitos. Atua também na mobilização do cálcio a partir do osso, na presença do paratormônio (PTH), e aumenta a reabsorção renal de cálcio no túbulo distal.⁽²⁾ A deficiência prolongada de vitamina D provoca raquitismo e osteomalácia e, em adultos, quando associada à osteoporose, leva a um risco aumentado de fratura.⁽¹⁾ Outras ações da vitamina D regulando positivamente a formação de osso incluem inibição da síntese de colágeno tipo 1, indução da síntese de osteocalcina e promoção da diferenciação de precursores celulares monócitos-macrófagos em osteoclastos. Além disso, estimula a produção do ligante RANK, promovendo um efeito que facilita a maturação dos precursores de osteoclastos, os quais mobilizam os depósitos de cálcio do esqueleto para manter a homeostase deste eletrólito.⁽²⁾

A vitamina D exerce suas funções biológicas através da sua ligação a receptores membranares e/ou nucleares.⁽²⁾ Esses receptores são expressos por vários tipos de células, incluindo epitélio do intestino delgado e tubular renal, osteoblastos, osteoclastos, células hematopoiéticas, linfócitos, células epidérmicas, células pancreáticas, miócitos e neurônios. Desta forma, níveis alterados desta vitamina também estão associados ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, neoplásicas e autoimunes.^(1,3) Em modelos experimentais, a deficiência de vitamina D já foi associada a casos mais agressivos de *diabetes mellitus*, provavelmente relacionados a anormalidades da função imune e aumento da resistência periférica à insulina.⁽¹⁾

Estudos apontavam inicialmente elevada prevalência de hipovitaminose D apenas em idosos, principalmente institucionalizados, devido ao novo platô de homeostasia, utilização de medicamentos e ao estilo de vida. Entretanto, outros trabalhos publicados posteriormente revelaram indicadores de morbidade preocupantes no que concerne a deficiência e insuficiência de vitamina D em crianças, adolescentes e adultos considerados hígidos.⁽⁴⁻⁸⁾ Na Bahia, não existem dados concisos e atualizados sobre a frequência de hipovitaminose D estratificada por faixa etária e sexo. Destarte, este trabalho se propõe a investigar a frequência de insuficiência e deficiência de vitamina D em indivíduos atendidos em um laboratório da cidade de Salvador.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de corte transversal com amostra de conveniência, baseado em informações registradas em prontuários, sobre frequência de alterações nos níveis séricos de vitamina D de pacientes atendidos pelo laboratório de análises clínicas da APAE. Os dados foram prospectados do sistema Smart Versões 2.1.4 12.115 e 02.06.02.00.115

por um membro da equipe executora, previamente treinado, e tabulados em uma planilha sem os nomes dos pacientes e com codificação própria, minimizando os riscos inerentes à quebra de sigilo. Foram incluídos todos os pacientes que possuíam resultados de vitamina D sem registro de suplementação vitamínica ou utilização de medicamentos que induzissem alterações no metabolismo da vitamina.

Os níveis séricos de vitamina D foram avaliados a partir da estratificação de grupos quanto à faixa etária, ao gênero e à procedência. As idades foram categorizadas nas seguintes faixas etárias: 0 a 11, 12 a 18, 19 a 59, 60 a 80 e acima de 80 anos. Para a procedência, a avaliação dos soteropolitanos foi embasada na divisão de 10 prefeituras – bairros (Centro/Brotas; Subúrbio/Ilhas; Cajazeiras; Itapuã/Ipitanga; Cidade Baixa; Barra/Pituba; Liberdade/São Caetano; Cabula/Tancredo Neves; Pau da Lima; Valéria), de acordo com o plano diretor de desenvolvimento urbano da Secretaria Municipal de Urbanismo da Prefeitura Municipal de Salvador. Os valores de referência utilizados para análise da vitamina foram os preconizados pelo Consenso sobre Diagnóstico e Tratamento da Deficiência de Vitamina D, publicado pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia, que categoriza níveis entre 2030ng/mL e 30ng/mL como insuficiente, abaixo de 20ng/mL como deficiente e superior a 30ng/mL, adequado. Níveis muito elevados ainda não estão bem definidos, embora haja a sugestão de concentração acima de 100ng/mL.⁽⁹⁾ Para a quantificação dos níveis de vitamina D, foi dosada a concentração de 25(OH)D, que representa a principal forma circulante da vitamina, a qual apresenta meia-vida de cerca de duas a quatro semanas. Embora a forma mais ativa da vitamina D₃ seja a 1,25(OH)2D, esta não foi utilizada para avaliar a concentração sérica de vitamina D, uma vez que sua meia-vida é de apenas 4 horas e sua concentração é 1.000 vezes menor do que a de 25(OH)D.⁽⁹⁾

O processamento e a análise dos dados, bem como a confecção dos gráficos e das tabelas foram realizados mediante utilização dos softwares Microsoft Excel 2019, SPSS versão 19.0 (Inc., Chicago, Estados Unidos) e *GraphPad Prism* versão 5.0. Os dados foram expressos em percentual, medida de tendência central ou valores mínimos e máximos. As variáveis contínuas foram testadas quanto à sua distribuição normal através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Nas análises descritivas, foram utilizados os testes de *Mann-Whitney* e *ANOVA* para as variáveis contínuas de distribuição não gaussiana e os testes de *chi-quadrado* ou de *Fisher* para as variáveis categóricas. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de *Spearman*. Para todos os testes, adotou-se modelos bicaudais com nível de significância de 0,05.

Quanto aos aspectos éticos, este trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Salvador, Parecer nº 3052586, e os procedimentos executados estão

em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS nº 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/*World Medical Association*).

RESULTADOS

Foram analisados 2.261 registros de pacientes que realizaram mensuração de vitamina D no laboratório da APAE. A amostra populacional estudada apresentou idade mínima de 1 ano e máxima de 99 anos (mediana = 53; IQ = 35 e 64), tendo 82,39% (n=1.863) de participantes do sexo feminino, 10,9% (n=246) de jovens com até 18 anos, 53% (n=1.196) de adultos com idade entre 19 e 59 anos e 36,1% (n=816) com mais de 60 anos. Os níveis séricos da vitamina D mostraram-se hipossuficientes em 70,2% (n=1.588) da amostra, dos quais 704 resultados (31,1,3%) foram categorizados como deficiente.

O sexo feminino desvelou concentração sérica da vitamina D menor em relação ao sexo masculino, 24,06 e 26,34 respectivamente (Figura 1.A). Entre as mulheres, evidenciou-se que 530 (28,45%) possuíam níveis suficientes de vitamina D, 602 (32,31%) níveis deficientes e 731 (39,24%) insuficientes. Entre os homens, 143 (35,93%)

apresentaram níveis adequados, 105 (26,38%) deficientes e 150 (37,69%) insuficientes (Figura 1.B).

Os níveis séricos da vitamina apresentaram correlação inversa com a idade ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,04$). Crianças de até 12 anos exibiram nível sérico da vitamina maior que as outras faixas etárias ($p < 0,0001$). Apesar de não ter diferença significativa, o estrato com mais de 80 anos apresentou os menores níveis. Pacientes com idade entre 60 e 80 anos apresentaram níveis mais baixos em relação aos adultos com idade entre 19 e 60 anos (Figura 2.A). Todavia, constatou-se em todos os estratos etários parcela significativa de hipovitaminose: 44,32% das crianças menores de 12 anos, 75,40% dos adolescentes entre 12 e 18 anos, 68,98% dos adultos entre 19 e 59 anos, 76,93% dos idosos entre 60 e 80 anos e 84,85% dos idosos acima de 80 anos (Figura 2.B).

Quanto à procedência, a análise dos 1.179 registros que continham esta informação preenchida indica que mais da metade dos pacientes foi proveniente das prefeituras – bairro Centro/Brotas (33,9%) e Barra/Pituba (26,78%). Em todas as regiões avaliadas, com exceção de Valéria, mais de 50% dos registros apontam valores inadequados da vitamina D, tendo destaque a região da Cidade baixa (83%) (Tabela 1).

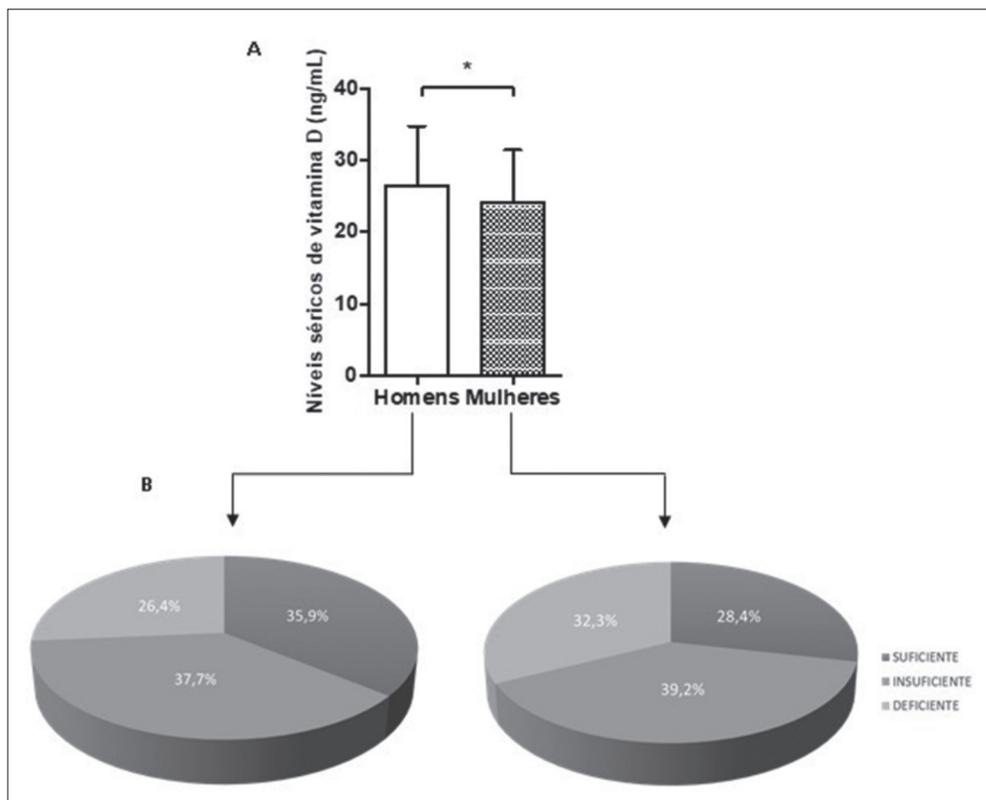


Figura 1. A. Concentração sérica (ng/mL) de vitamina D em homens (n=398; mediana: 26,34; IQ:19,57-34,76) e mulheres (n=1.863; mediana: 24,06; IQ:18,34-31,40). B. Categorização dos níveis séricos de vitamina D em suficiente (>30ng/mL), insuficiente (20 a 29ng/mL) e deficiente (<20 ng/mL). *Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

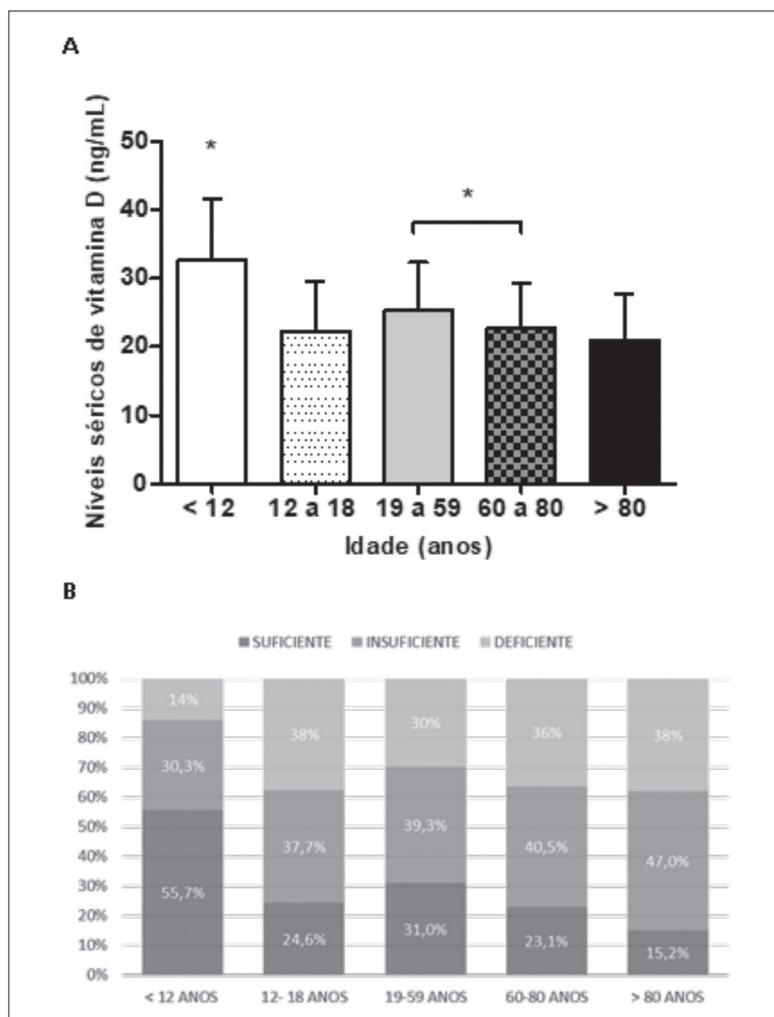


Figura 2. A. Concentração sérica (ng/mL) de vitamina D nos estratos etários <12 anos (n=187; mediana: 32,69; IQ: 23,85-41,55), 12 a 18 anos (n=61; mediana: 22,3; IQ: 17,09-29,51), 19 a 59 anos (n=1.196; mediana: 25,29; IQ:18,7-32,37), 60 a 80 anos (n=750; mediana: 22,81; IQ:117,55-29,34) e > 80 anos (n=67; mediana: 20,95; IQ:16,50-27,77). B. Categorização dos níveis séricos de vitamina D em suficiente (>30ng/mL), insuficiente (20 a 29ng/mL) e deficiente (<20ng/mL) de acordo com a faixa etária. *Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, p<0,0001.

Tabela 1 - Distribuição da categorização dos níveis séricos de vitamina D por Prefeitura – Bairro de Salvador

Procedência	nº	Suficiência em vitamina D (%)		
		Suficiente	Insuficiente	Deficiente
Barra/Pituba	290	29,3	38,3	32,4
Cabula/Tancredo Neves	101	34,7	33,7	31,7
Cajazeiras	43	32,6	39,5	27,9
Centro/Brotas	376	30,6	37,8	31,6
Cidade Baixa	53	17,0	47,2	35,8
Itapuã	123	35,0	43,1	22,0
Liberdade/São Caetano	97	34,0	37,1	28,9
Pau da Lima	41	43,9	39,0	17,1
Subúrbio/Ilhas	46	45,7	26,1	28,3
Valéria	9	66,7	33,3	0,0

DISCUSSÃO

A hipovitaminose D constitui uma pandemia não reconhecida que acomete aproximadamente 1 bilhão de indivíduos de todas as faixas etárias e gêneros e que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças etiológicamente diversas, como cardiovasculares, metabólicas, inflamatórias, autoimunes e neoplásicas.^(1,3,10) O presente estudo aponta que aproximadamente dois-terços da amostra populacional estudada apresentaram níveis séricos reduzidos de vitamina D, desvelando de forma inédita um percentual elevado desta hipovitaminose na capital baiana.

Corroborando nosso resultado, outros estudos conduzidos no país também revelaram elevada prevalência desta hipovitaminose. Em São Paulo, um estudo com 603 pessoas, utilizando os mesmos valores de referência do presente trabalho, evidenciou que aproximadamente 80% dos adultos hígidos analisados apresentavam níveis reduzidos da vitamina D.⁽⁷⁾ Pesquisa realizada na região metropolitana de Belo Horizonte demonstrou que 43% dos 132 pacientes analisados apresentavam concentração sanguínea inadequada da vitamina D.⁽¹¹⁾ Ronchi e colaboradores⁽¹²⁾ mostraram uma prevalência de 70% desta hipossuficiência em um estudo conduzido em Curitiba. Outros estudos conduzidos em países da América do Norte,^(13,14) Europa e Ásia^(15,16) também revelaram percentuais elevados do agravo. A prevalência elevada desta hipovitaminose em diferentes regiões, mesmo de baixa latitude, pode estar correlacionada à inadequação do aporte nutricional da vitamina e a mudanças no estilo de vida da população com redução da exposição solar e intensificação da fotoproteção para evitar danos à epiderme e derme.⁽¹⁷⁾

Em relação ao gênero, nosso trabalho identificou níveis menores de vitamina D no sexo feminino, ratificando os achados de outros estudos conduzidos no país⁽¹⁸⁾ e em outros países da América⁽¹⁹⁾ que apontam prevalência elevada de hipovitaminose nas mulheres. Nosso estudo, com avaliação de 1.863 mulheres de todas as faixas etárias, apontou concentrações de vitamina D ainda mais baixas que o estudo multicêntrico conduzido por Arantes⁽²⁰⁾ em 2013, que avaliou 104 mulheres em período de pós-menopausa em Salvador. As mudanças comportamentais das mulheres para retardar o envelhecimento cutâneo em decorrência das marcantes alterações ambientais nos últimos anos podem estar implicadas nestes achados, uma vez que os raios ultravioleta desempenham papel crucial na rota metabólica da síntese de vitamina D. Um estudo conduzido em outro município da Bahia, Santo Antônio de Jesus, demonstrou que 59% das gestantes analisadas apresentavam hipossuficiência de vitamina D, revelando a necessidade de alterações nos hábitos cotidianos e de suplementação para evitar o desenvolvimento de agravos para os bebês.⁽²¹⁾ Embora o período gestacional possa contribuir para a inadequação do aporte de alguns nutrientes, evidências revelam que mais

de 90% das brasileiras com idade entre 19 e 59 anos estão expostas a ingestão insuficiente da vitamina D.⁽²²⁾

Em todas as faixas etárias, mais de 44% dos indivíduos apresentaram hipossuficiência em vitamina D, tendo destaque as pessoas com mais de 60 anos. Outros estudos também revelam a redução da concentração da vitamina em idosos,⁽²³⁾ principalmente nos institucionalizados,⁽²⁴⁾ devido provavelmente à menor exposição solar e utilização de terapia medicamentosa que comprometa a absorção e metabolização da vitamina. Estudos conduzidos na Argentina, no Chile e no México evidenciaram prevalência elevada de deficiência e insuficiência de vitamina D em crianças e adolescentes.⁽²⁵⁻²⁷⁾ No Brasil, existem evidências de hipovitaminose D em mais de um-terço das crianças de municípios da região sul⁽²⁸⁾ e centro-oeste.⁽⁶⁾ Na Bahia, são escassos os trabalhos que analisam hipovitaminose D em estratos mais jovens. Entretanto, corroborando nosso resultado, um estudo conduzido em São Francisco do Conde, no Recôncavo Baiano, demonstrou 58,3% de hipovitaminose em crianças de 6 a 13 anos.⁽²⁹⁾ Destarte, nossos resultados apontam taxas elevadas de hipossuficiência de vitamina D, independente da idade, e suportam a necessidade de implementação e/ou intensificação de medidas de educação nutricional. Apesar da suplementação com a vitamina D ser segura e financeiramente acessível, estudos apontam ser imprescindível suplementar com a dose adequada e monitorar laboratorialmente para certificação dos níveis séricos da vitamina, bem como revisar os valores de referência para os níveis séricos de vitamina D considerando outras avaliações clínico-laboratoriais.⁽³⁰⁾

Quanto à procedência, todas as regiões, com exceção de Valéria, apresentaram prevalência de hipovitaminose acima de 50%, tendo a região da Cidade Baixa a maior prevalência. Fatores ambientais, como poluição, podem reduzir a incidência de raios ultravioleta e, conseqüentemente, comprometer a rota anabólica da vitamina D. Apesar do quantitativo reduzido de pessoas analisadas neste estudo, provenientes de algumas regiões, não fornecer suporte para inferências, este é o primeiro estudo na capital baiana a analisar a insuficiência de vitamina D sob a ótica espacial. Outros estudos com amostra representativa serão conduzidos para elucidar a distribuição espacial da hipossuficiência de vitamina D na cidade de Salvador.

CONCLUSÃO

O estado de hipossuficiência em vitamina D foi mais prevalente em mulheres e os níveis séricos da vitamina correlacionaram-se inversamente à idade, sendo a condição de hipovitaminose predominante nos estratos etários acima de 12 anos. Estudos futuros serão conduzidos para validar estes resultados e avaliar possíveis correlações com alterações em outros biomarcadores séricos.

Abstract

Objective: To assess the frequency of vitamin D hypo-sufficiency in patients at a clinical analysis laboratory in Salvador between the years 2015 and 2018. **Methods:** This is a cross-sectional study with a convenience sample. Data on the dosage of 25-hydroxy-vitamin D (OH25) from patients seen at the Clinical Analysis Laboratory of APAE were prospected. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism software based on stratification by serum vitamin D levels, gender, age and origin of the patient. The reference values used in the analysis of vitamin D are in line with the recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology. **Results:** 2,263 patients aged 1 to 99 years (median = 53; IQ = 35 and 64) were evaluated, 82.39% of whom were female. Among the 1,863 women analyzed, 602 (32.31%) revealed deficient levels and 731 (39.24%) insufficient levels. Among men, 105 (26.38%) were categorized as deficient and 150 (37.69%) were insufficient. Children under 12 years old had the highest levels of vitamin D (median = 32.69) and adults over 80 years old had the lowest levels (median = 20.95). All age groups showed more than 40% of individuals with low vitamin D deficiency. **Conclusion:** The studied sample showed a high percentage of hypovitaminosis D, to be revealing the need for reflection by organs competent of vitamin D supplementation in the general population or the adjustment of reference values.

Keywords

Vitamin D; Deficiency; Clinical Analysis

REFERÊNCIAS

- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-81.
- Holick MF. Vitamin D: Photobiology, metabolism, and clinical applications. In: de Groot LC, ed. *Endocrinology*, 1995; 990-1011.
- Peterlik M & Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 2005;35:290-304.
- El-Hajj Fuleihan G, Nabulsi M, Choucair M, Salamoun M, Hajj Shahine C, Kizirian A, Tannous R. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics* 2001;107:E53.
- Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab* 2009;54:15-21.
- Santos BR, et al. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr.* [S.l.], 2012; v.12:62.
- Unger MD. Hipovitaminose D em uma amostra de brasileiros saudáveis: um achado inesperado. *OsteoNews*, 2011.
- Premaor MO, Furlanetto TW. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50; n.1; São Paulo, Feb. 2006.
- Holick MF, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* [S.l.], 2011; v.96, p.1911–30.
- Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144 Pt A:138-145. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.003.
- Silva, Barbara C., et al. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e correlação com PTH, marcadores de remodelação ossea e densidade mineral ossea, em pacientes ambulatoriais. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, 2008.
- Ronchi FC, Sonagli M, Ronchi MG. Prevalência de Hipovitaminose D em população de consultório médico. *Rev. Med. Res.* 2012.
- Schleicher RL, Sternberg MR, Looker AC, Yetley EA, Lacher DA, Semplos CT, et al. National estimates of serum total 25-Hydroxyvitamin D and metabolite concentrations measured by liquid chromatography–Tandem mass spectrometry in the US population during 2007–2010. *J Nutr.* 2016;146:1051–61.
- Sarafin K, Durazo-Arvizu R, Tian L, Phinney KW, Tai S, Camara JE, et al. Standardizing 25-hydroxyvitamin D values from the Canadian Health Measures Survey. *Am J Clin Nutr.* 2015;102:1044–50.
- Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr.* 2016;103:1033–44.
- Cashman KD. Vitamin D deficiency: defining, prevalence, causes, and strategies of addressing. *Calcif Tissue Int.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00559-4>.
- Pinheiro MM, Ciconelli RM, Chaves GV, Aquino L, Juzwiak CR, Genaro PDS, et al. Antioxidant intake among Brazilian adults - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS): a cross-sectional study. *Nutr J* [Internet]. *BioMed Central Ltd*; 2011;10(1):39.
- Araujo EP, Queiroz DJ, Neves JPR, Lacerda LM, Gonçalves MCR, Carvalho AT, et al. Prevalence of hypovitaminosis D and associated factors in adolescent students of a capital of northeastern Brazil. *Nutrición Hospitalaria* 2017; 34: 1416-1423.
- Fradinger EE, Zanchetta JR. Vitamin D status in women living in Buenos Aires. *Medicina (B Aires)* 1999;59:449-52.
- Arantes HP, Kulak CAM, Fernandes CE, Zerbini C, Bandeira F, Barbosa IC, Lazaretti-Castro M. (2013). Correlation between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arzoxifene Generations Trial. *Osteoporosis International*, 24(10), 2707–2712.
- Pereira-Santos, Marcos. Determinantes socioambientais das concentrações séricas de vitamina D em gestantes / Marcos Pereira Santos. – Salvador, 2014. 102 p. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2014.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011.
- Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L, et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int.* 2009;20:133-40.
- Saraiva GL, et al. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatoidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na Comunidade da Cidade de São Paulo, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.* 2007.
- Brito A, Cori H, Olivares M, et al. Less than adequate vitamin D status and intake in Latin America and the Caribbean: a problem of unknown magnitude. *Food Nutr Bull* 2013;34(1):52-64.
- Durán P, Mangialavori G, Biglieri A, et al. Estudio descriptivo de la situación nutricional en niños de 6-72 meses de la República Argentina. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). *Arch Argent Pediatr* 2009;107(5):397-404.
- Le Roy C, Reyes M, González JM, et al. Estado nutricional de vitamina D en pre escolares chilenos de zonas australes. *Rev Med Chil* 2013;141(4):435-41.
- Bastos MD, Silveira TR. Níveis plasmáticos de vitamina D em crianças e adolescentes com colestatase. *Sociedade Brasileira de Pediatria.* 2003.
- Galvão AA. Associação dos níveis séricos de vitamina D com atopia e asma em escolares do Recôncavo Baiano / Alana Alcântara Galvão. – Salvador, 2013. 98 f.
- Manson JE, Brannon PM, Rosen CJ, & Taylor CL. (2016). Vitamin D Deficiency — Is There Really a Pandemic? *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1817–1820.

Correspondência

Marcus Vinicius Alves Lima

Universidade Salvador (UNIFACS)

Campus Prof. Barros, Av. Luís Viana Filho nº 3146 / 3100.

Pituaçu, Salvador - Bahia. CEP. 41.720-200

Perfil de suscetibilidade antimicrobiana em infecções do sítio cirúrgico em um hospital público de traumatologia-ortopedia no Nordeste do Brasil

Antimicrobial susceptibility profile in surgical site infections in the trauma and orthopedic service of a public hospital in the Brazilian Northeast region

Jair Figueredo dos Santos¹

Júlio César Gomes da Silva²

Maria Amália Ribeiro de Amorim

Vasconcelos³

Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen⁴

Resumo

Objetivo: As infecções de sítios cirúrgicos (ISC) constituem a terceira maior classe de infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil e estão consideravelmente aumentadas em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos ortopédicos. Grande parte das ISC ortopédicas relacionam-se a bactérias Gram-positivas, dentre elas *Staphylococcus* ssp. Outros microrganismos comumente encontrados são: *Enterococcus* ssp., assim como bactérias Gram-negativas, com destaque para *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*. O presente estudo objetivou identificar a frequência de infecções bacterianas em sítios cirúrgicos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana. **Métodos:** Estudo retrospectivo com análise de resultados microbiológicos de pacientes atendidos no serviço de traumatologia-ortopedia em hospital público de referência, entre agosto de 2016 a setembro de 2018. **Resultados:** Do total de 258 amostras enviadas ao laboratório, 138 isolados foram positivos, 84% foram pacientes masculinos, nos quais 32 espécies de bactérias foram identificadas, sendo as mais frequentes *Staphylococcus aureus* (25,2%), *Enterococcus faecalis* (10,8%), seguido das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (9,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9,9%). A suscetibilidade antimicrobiana revelou que 87,5% dos *Staphylococcus aureus* isolados eram MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina) e sensíveis a vancomicina (96,4%) e Teicoplanina (98,2%). Considerando as Gram negativas, este estudo mostrou que houve frequência similar entre *Escherichia coli* (9,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9,9%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (8,1%). A *Escherichia coli*, apresentou altas taxas de resistência às cefalosporinas e penicilinas. **Conclusão:** O perfil microbiológico e a suscetibilidade antimicrobiana devem ser considerados na determinação das terapias antimicrobianas adequadas para controle das infecções hospitalares, possibilitando uso racional de antibióticos e diminuição da resistência bacteriana.

Palavras-chave

Infecção da Ferida Cirúrgica; Ortopedia; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; Farmacorresistência Bacteriana

INTRODUÇÃO

As infecções de sítios cirúrgicos (ISC), definida como infecções decorrentes de procedimentos cirúrgicos, representam entre 14% e 16% das infecções em pacientes internados em unidades de saúde no Brasil.⁽¹⁾ Em países europeus e países da América do Norte, as ISC variam em aproximadamente 2% a 5% para pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos. Por ano, nos Estados Unidos o número de ISC gira em torno de 500.000 casos.^(2,3)

As ISC estão consideravelmente aumentadas em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos ortopédicos devido, muitas vezes, a necessidade de utilização de materiais de implantes.⁽⁴⁾ A presença de próteses articulares, parafusos, fixadores externos, dentre outros materiais utilizados para estabilizar estruturas ósseas ou reparar fraturas, pode facilitar processos de infecção por meio da contaminação local ou disseminação via corrente sanguínea, o que conseqüentemente eleva as taxas de morbimortalidade para esses pacientes. As ISC têm tornado

¹ Biomédico/Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada BCMA/UPE.

² Biomédico/Centro Universitário Tiradentes de Pernambuco. Mestrando em Morfotecnologia - PPGM/UFPE.

³ Farmacêutica/Bioquímica. Especialista em Patologia Clínica - Universidade de Pernambuco - UPE.

⁴ Professora, Doutora. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

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

Recebido em 06/04/2020

Aprovado em 07/05/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202101978

ainda mais prolongado o processo de recuperação da saúde aumentando consequentemente, aumentando os custos relacionados ao tempo de internação para o Sistema Único de Saúde (SUS), além de comprometer a qualidade de vida dos pacientes ortopédicos.^(4,5)

Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento das ISC são classificados em intrínsecos e extrínsecos. Fatores que se correlacionam diretamente com o paciente, como idade, presença de comorbidades, processos infecciosos diversos, obesidade, imunossupressão, além de tempo prolongado do pré e pós-operatório, são ditos como fatores intrínsecos. Já os fatores relacionados ao ambiente, tais como superfícies hospitalares, materiais cirúrgicos, antisepsia de mãos e uso adequado de equipamentos de proteção pelos profissionais de saúde, são considerados fatores extrínsecos.^(4,6,7)

O início dos sintomas, a gravidade e a manutenção da infecção estão diretamente relacionados ao tipo de microrganismo que coloniza um sítio cirúrgico ortopédico.⁽⁵⁾ Grande parte das ISC ortopédicas estão relacionadas a bactérias que constituem a microbiota normal da pele, dentre elas *Staphylococcus ssp./ Staphylococcus aureus*.⁽⁸⁾ Outros microrganismos comumente encontrados são *Enterococcus spp.*, assim como uma variedade de bactérias Gram-negativas, com destaque para *Pseudomonas aeruginosas*, *Enterobacter spp.*, e *Klebsiella spp.*⁽⁹⁾

A presença de bactérias como *S. aureus* e *S. epidermidis* pode levar ao desenvolvimento de biofilmes, que contribuirão para a patogenicidade da bactéria na infecção.⁽⁵⁾ O biofilme é formado pela associação de bactérias que desenvolvem uma matriz extracelular altamente aderente, proporcionando sua fixação a superfícies do hospedeiro ou materiais de implantes ortopédicos presentes no sítio cirúrgico. Inicialmente as bactérias aderem à superfície gerando acúmulo e associação a outras bactérias, formando assim camadas, e produção de matriz extracelular. Uma vez formado, o biofilme se mantém no local inicial da infecção e pode também se desmembrar e seguir o ciclo para formação de novas placas de biofilme em outros sítios.⁽¹⁰⁾ Dentro da cápsula de biofilme, as bactérias adquirem propriedades diferentes daquelas que vivem de forma livre. Essa cápsula é capaz de proteger as bactérias da ação direta de antibióticos bem como de mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro.^(5,10)

A identificação correta dos microrganismos bem como a determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos são necessárias para o combate às ISC e, consequentemente, para o sucesso terapêutico.⁽¹⁾ Dessa forma, não é recomendado o uso de *swabs* para coleta de material e avaliação microbiológica, sendo preferível a realização de aspirados líquidos ou biópsia do tecido. Ainda, é recomendável que líquidos provenientes de articulações sejam cultivados em garrafas para hemocultura. Materiais como próteses

articulares, ossos, parafusos e placas devem ser submetidos a processo de sonicação e/ou vórtex no intuito de romper possíveis biofilmes formados aderidos à superfície desses materiais e, assim, ocorrer a liberação de microrganismos viáveis para isolamento e identificação microbiológica.⁽¹¹⁾

ISC de pacientes ortopédicos podem comprometer o sucesso da recuperação no pós-operatório e estão relacionadas à capacidade do sistema imunológico do indivíduo de combater a infecção, bem como à presença de resistência bacteriana por meio da formação de biofilmes. A manutenção da infecção acarreta internações prolongadas e maior número de intervenções cirúrgicas que elevam as taxas de morbimortalidade para pacientes ortopédicos.⁽¹²⁾

A ANVISA preconiza que as amostras sejam obtidas por procedimento cirúrgico ou mesmo por punção aspirativa de forma asséptica. A quantidade de amostra deve ser suficiente para a realização de uma bacterioscopia pela técnica de coloração de Gram ou Ziehl-Neelsen, cultivo de bactérias aeróbicas e facultativas, adicionalmente, de acordo com a suspeita, cultura de fungos, micobactérias e bactérias anaeróbicas.⁽¹³⁾

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou identificar a frequência de infecções bacterianas de sítios cirúrgicos e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana a partir de resultados de cultura de pacientes atendidos no serviço de ortopedia e traumatologia de um hospital público de referência na cidade do Recife.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, descritivo, transversal de abordagem quantitativa, desenvolvido no laboratório de microbiologia do serviço de patologia clínica de um hospital público geral de alta complexidade, referência no Estado de Pernambuco, na área de ortopedia e traumatologia. Realizado no período de agosto de 2016 a setembro de 2018.

Foram analisados laudos com resultados de culturas de amostras provenientes de pacientes internados no serviço de ortopedia e traumatologia de um hospital público geral de alta complexidade. Os dados foram coletados a partir de resultados do sistema automatizado de identificação e suscetibilidade antimicrobiana do VITEK® 2 compact (bioMérieux), liberados pela equipe técnica e registrados em livros arquivados no serviço de microbiologia do laboratório de patologia clínica de um hospital público geral de alta complexidade. Informações adicionais sobre dados demográficos dos pacientes foram coletados no sistema Soul MV, utilizando o número de prontuário do paciente.

A utilização de meio de cultura líquida BHI (*Brain Heart Infusion*) ou salina foi necessária para melhor liberação das bactérias em materiais secos ou com grande potencial de formação de biofilmes como fragmentos ósseos, parafusos e

placas, dentre outros, submetidos ao vórtex, proporcionando, desta forma, o enriquecimento do meio e melhor recuperação de microrganismos viáveis. Os dados dos livros de registros de cultura de secreções gerais e materiais diversos foram gerados pelo setor de microbiologia, a partir do semeio de amostras diversas (partes moles, fragmentos ósseos de diversos sítios anatômicos, material de síntese, parafusos, dentre outros) em meios sólidos em placas (ágar sangue e meio cromogênico) com incubação em estufa a 35°C ± 1°C por 24 a 48 horas.

Para a identificação após o crescimento bacteriano nos meios semeados, foi realizada uma observação para identificação presuntiva de Gram-negativo (GN), Gram-positivo (GP) e fungo com posterior identificação do sistema VITEK® 2 compact (bioMérieux), um método automatizado que se baseia em reações bioquímicas e utilização da espectrofotometria para identificação dos microrganismos em cartões de 64 poços contendo substratos e antibióticos.^(14,15)

Por meio dos cartões VITEK® 2 GN e GP foram realizadas as identificações de espécies de GN e GP de importância clínica. Para identificar a suscetibilidade aos antimicrobianos foram utilizados VITEK® 2 AST (*Antimicrobial Susceptibility Testing*) para GN e GP.

Os dados obtidos foram catalogados utilizando o programa Microsoft® Office Excel para Mac versão 2016 e *Graphpad Prism* versão 5.0, de acordo com as variáveis: gênero, idade, número de amostras positivas, espécies de microrganismos identificados e perfil de suscetibilidade antimicrobiana tanto para GN quanto para GP. As frequências das variáveis foram analisadas a partir do quociente do valor total de isolados analisados e pela frequência absoluta encontrada para cada variável, apresentadas em forma de percentual.

Este estudo teve seu delineamento e metodologia em consonância com os princípios bioéticos e morais previstos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). E teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, sob o seguinte número de CAAE: 98574918.6.0000.5192.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2016 a dezembro de 2018, de acordo com dados obtidos no sistema SoulMV (Sistema de Gerenciamento de Internação) foram realizadas 394 internações na clínica traumatológica, 324 na clínica ortopédica e 835 na clínica de ortopedia C de apoio ao trauma.

No período em estudo, de agosto de 2016 a setembro de 2018, houve recebimento de 258 amostras de pacientes provenientes das referidas enfermarias, com suspeita clínica de infecção. Desse total, 138 amostras (53,5%) apresentaram crescimento microbiano, sendo caracterizadas como amostras positivas (Figura 1). Das 138 amostras positivas,

116 (84%) foram pacientes do sexo masculino, com idades que variaram entre 16 a 85 anos; 22 (16%) eram do sexo feminino com idades entre 25 e 77 anos (Figura 2). A média geral de idade dos pacientes foi de 40 anos.

Após a conclusão do diagnóstico laboratorial por meio do sistema automatizado VITEK® 2 compact (bioMérieux), foram identificadas 31 diferentes espécies de bactérias de diversos gêneros, sendo a mais frequente o *Staphylococcus aureus* (25,2%) seguido de *Enterococcus faecalis* (10,8%), *Escherichia coli* (9,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9,9%). Os demais microrganismos encontrados foram: *Klebsiella pneumoniae* (8,1%), *Enterobacter cloacae* (7,7%), *Proteus mirabilis* (4,1%), *Acinetobacter baumannii* (4,1%), *Morganella morganii* (3,2%), *Staphylococcus epidermidis* (2,7%), *Aeromonas hydrophila* (1,8%) e *Serratia marcescens* (1,4%). Microrganismos com prevalência de isolamento inferior a 3 casos foram considerados em outros (11,3%) (Figura 3). Em 52 amostras, foram isolados mais de um microrganismo, dentre estas 32 tinham associadas bactérias GN e GP, 18 amostras tiveram duas GN ou mais e apenas 2 apresentaram duas GP ou mais.

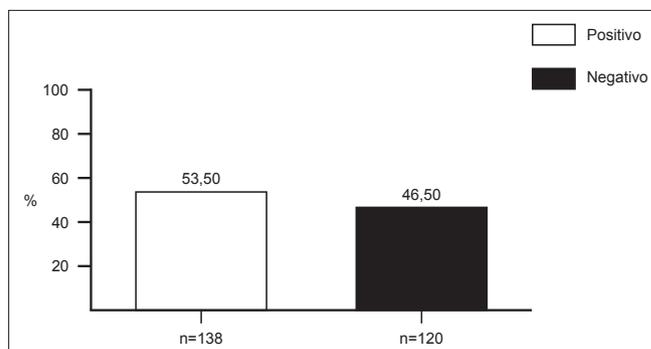


Figura 1. Positividade de culturas realizadas para pacientes das clínicas de traumatologia e ortopedia no laboratório de microbiologia de um hospital público de alta complexidade, referência em trauma e ortopedia, na cidade do Recife, no período de agosto de 2016 a setembro de 2018.

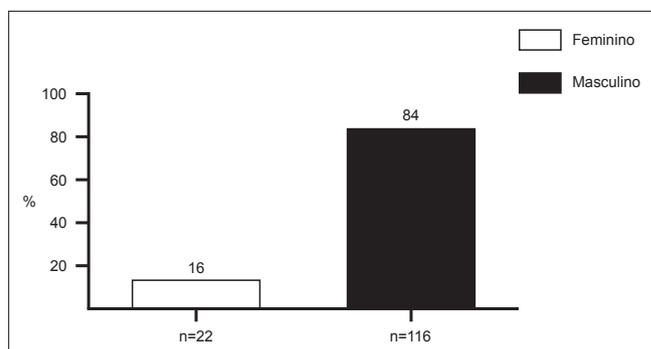


Figura 2. Distribuição por gênero dos pacientes das clínicas de ortopedia e traumatologia com culturas positivas realizadas no laboratório de microbiologia de um hospital público de alta complexidade, referência em trauma e ortopedia, na cidade do Recife, no período de agosto de 2016 a setembro de 2018.

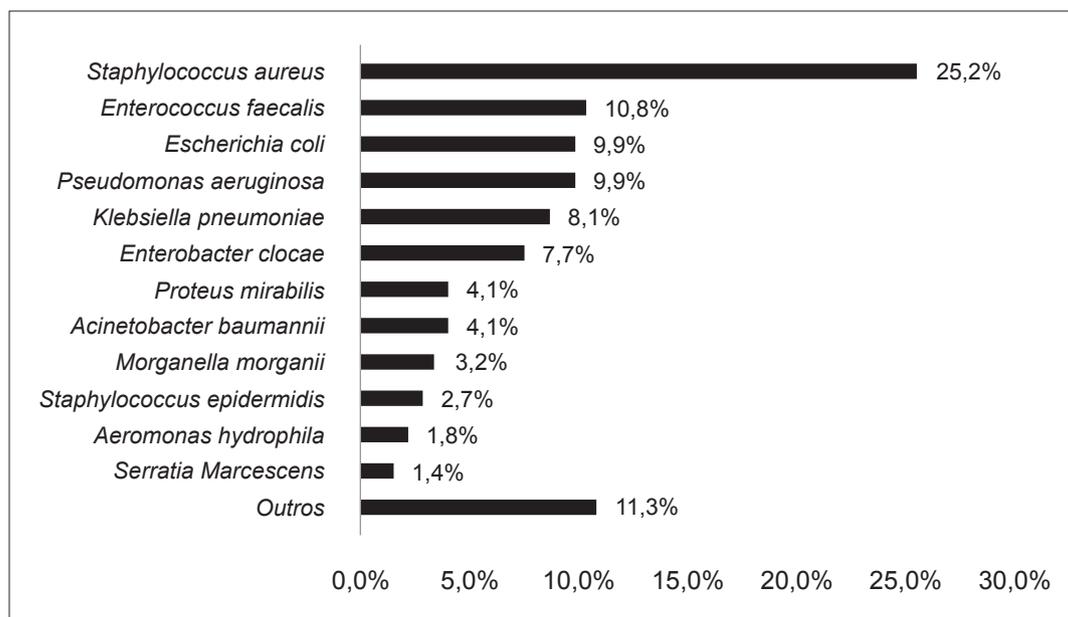


Figura 3. Frequência de agentes patogênicos isolados de 138 amostras de sítios cirúrgicos de pacientes atendidos no serviço de ortopedia e traumatologia de um hospital público de alta complexidade referência em trauma e ortopedia, na cidade do Recife, no período de agosto de 2016 a setembro de 2018.

Para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, a análise do perfil de resistência/sensibilidade foi realizada para os microrganismos GN e GP isolados com maior frequência. Foram considerados os seguintes antibióticos para o representante GP, *Staphylococcus*

aureus: Gentamicina, Rifampicina, Cefoxitina, Teicoplanina, Vancomicina, Trimetropina/sulfametoxazol, Clindamicina, Eritromicina, Linezolida, Oxacilina, Benzilpenicilina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina e Tigeciclina, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de pacientes atendidos no período de agosto de 2016 a setembro de 2018 nas enfermarias de ortopedia, traumatologia e apoio ao trauma de um hospital público de alta complexidade, referência em trauma e ortopedia, na cidade do Recife.

Classe de antimicrobianos	Antibiótico	Sensíveis	%	Resistentes	%
Aminoglicosídeo	Gentamicina	28	50,0	28	50,0
Ansamicina	Rifampicina	3	5,4	53	94,6
Cefalosporina	Cefoxitina	1	1,8	55	98,2
Glicopeptídeos	Teicoplanina	55	98,2	1	1,8
	Vancomicina	54	96,4	2	3,6
Inibidores do ácido fólico	Trimetoprim/ sulfametoxazol	33	58,9	23	41,1
Macrolídeos	Clindamicina	6	10,7	50	89,3
	Eritromicina	3	5,4	53	94,6
Oxazolidinona	Linezolida	54	96,4	2	3,6
Penicilina	Oxacilina	7	12,5	49	87,5
	Benzilpenicilina	0	0,0	56	100,0
	Ampicilina	0	0,0	56	100,0
Quinolonas	Ciprofloxacina	7	12,5	49	87,5
	Moxifloxacina	5	8,9	51	91,1
Tetraciclina	Tigeciclina	36	64,3	18	32,1

Para o principal representante dos GN, a *Escherichia coli*, foram considerados os seguintes antibióticos: Ampicilina, Ampicilina/sulbactam, Piperacilina/tazobactam, Cefuroxina, Cefuroxina Axetil, Cefoxitina, Ceftazidima,

Ceftriaxona, Cefepima, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Tigeciclina, Colistina, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade de *Escherichia coli* isolados de amostras de pacientes atendidos no período de agosto de 2016 a setembro de 2018 nas enfermarias de ortopedia, traumatologia e apoio ao trauma de um hospital público de alta complexidade, referência em trauma e ortopedia, na cidade do Recife. SSD*= sensível dose dependente.

Classe de antimicrobianos	Antibiótico	Sensíveis	%	Resistentes	%	Intermediário
Penicilinas	Ampicilina	2	10	16	80	2 (10%)
b-lactâmico/ inibidores de b-lactamase	Ampicilina/ sulbactam	7	35	12	60	1 (5%)
	Piperacilina/ tazobactam	14	70	6	30	
Cefalosporinas	Cefuroxina	0	0	20	100	
	Cefuroxina/Axetil	0	0	20	100	
	Cefoxitina	6	30	14	70	
	Ceftazidima	5	25	15	75	
	Ceftriaxona	6	30	14	70	
	Cefepima	15	75	4	20	SDD* 1(5%)
Carbapenêmicos	Ertapenem	15	75	5	25	
	Imipenem	15	75	5	25	
	Meropenem	17	85	3	15	
Aminoglicosídeos	Amicacina	13	65	7	35	
	Gentamicina	12	60	8	40	
Quinolonas e fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	7	35	13	65	
	Levofloxacina	8	40	12	60	
Tetraciclina	Tigeciclina	11	55	9	45	
Polimixina	Colistina	12	60	8	40	

DISCUSSÃO

Dentro das ISC, as infecções relacionadas a procedimentos cirúrgicos ortopédicos se destacam por serem consideradas de altíssima gravidade. Por se utilizarem de materiais de implantes, o risco de surgimento de processos infecciosos pode levar à necessidade de novas intervenções cirúrgicas, que por sua vez aumentam o risco de perda do membro, os índices de disseminação da infecção para outros sítios levam a um provável surgimento de sepse ou até mesmo levar o paciente a óbito.^(4,6)

O conhecimento do tipo de microrganismo bem como de seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é de extrema importância para entendimento da gravidade, da evolução e do prognóstico das infecções relacionadas à implementação de dispositivos ortopédicos, bem como das infecções associadas a sítios cirúrgicos em procedimentos ortopédicos. Esse conhecimento também contribui para evitar o risco de disseminação de resistência bacteriana e

consequente persistência da infecção por meio da utilização adequada dos antimicrobianos.⁽¹⁶⁾

Estudo realizado por García e colaboradores (2019) destaca as infecções associadas a dispositivos ortopédicos e ISC em ortopedia, nas quais microrganismos GP, aqueles que compõem a microbiota normal da pele, como *Staphylococcus aureus* e outras *Staphylococcus* coagulase negativas, são os principais agentes causadores para esses tipos de infecções, e isso ocorre devido ao aspecto oportunista da bactéria. Porém, outros microrganismos como *Enterococcus* e bacilos Gram-negativos, com destaque para *Escherichia coli* e, adicionalmente, *Pseudomonas aeruginosas*, *Enterobacter spp.* e *Klebsiella spp.* foram isolados frequentes de infecções ortopédicas neste estudo.⁽¹⁷⁾

No presente estudo, dos 258 exames de amostras diversas enviadas das enfermarias de ortopedia e traumatologia ao laboratório de microbiologia, no período de agosto de 2016 a setembro de 2018, 53,5% (n=138) dos isolados apresentaram crescimento positivo. A maior frequência foi

encontrada em pacientes do sexo masculino, total de 116 (84%), fator esse relacionado à característica das clínicas de ortopedia e traumatologia, que atendem com mais frequência pacientes do sexo masculino. Santos e colaboradores (2016), em estudo epidemiológico do trauma ortopédico em um serviço público de emergência, encontraram resultados similares, nos quais pacientes do sexo masculino corresponderam por cerca de 81% dos usuários atendidos, fato este justificado por um maior envolvimento dessa população em acidentes de trânsito.⁽¹⁸⁾

Neste estudo, foi observado que *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais frequente, o qual esteve presente em 56 (25,2%) dos isolados de amostras da população estudada. O estudo de suscetibilidade antimicrobiana revelou que 49 (87,5%) dos *Staphylococcus aureus* isolados eram resistentes a Oxacilina ORSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina) ou MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina). De forma geral, a maior parte dos *Staphylococcus aureus* apresentou boa sensibilidade para Vancomicina (96,4%) e Teicoplanina (98,2%), que são os glicopeptídeos de escolha para infecções causadas por MRSA, além da Linezolida (96,4%) e Tigeciclina (64,3%).⁽¹⁹⁾

A variação de frequência de MRSA relacionada a sítios de infecções cirúrgicas em ortopedia apresentada na literatura foi de 29,11% a 63,0%.^(9,20) Um estudo de Silvia e colaboradores (2013) evidenciou que do total de infecções adquiridas dentro do ambiente hospitalar, 26 (14,86%) foram causadas por *Staphylococcus aureus* e, destes, 17 (65,38%) eram MRSA.⁽²¹⁾ Uma vez que os principais sítios anatômicos fonte de MRSA são as fossas nasais e mãos, a principal forma de disseminação de MRSA no ambiente hospitalar ocorre pelas mãos dos diversos profissionais de saúde.^(22,23)

Um estudo de ordem econômica sobre custos das ISC realizado por Stone (2009) evidenciou que o custo médio mensal por infecção era de \$ 25. 546, 000 dólares para hospitais nos Estados Unidos. Quando a infecção é causada por microrganismos multidroga-resistente como por MRSA, o custo por infecção pode aumentar em aproximadamente \$ 4.000 dólares quando comparada às infecções por *Staphylococcus aureus* suscetíveis a metilicina/oxacilina.⁽²⁴⁾ Este aumento do custo pode ser atribuído a um estendido período de hospitalização, necessidade de utilização de antimicrobianos mais caros e a gastos, de maneira mais indireta, oriundos de medidas de prevenção e controle da infecção.⁽¹⁹⁾

Considerando a frequência de isolamento de bactérias Gram-negativas, este estudo mostrou que houve uma frequência similar entre *Escherichia coli* (9,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9,9%), seguida de *Klebsiella pneumoniae* (8,1%). Achados similares foram relatados por García e colaboradores (2019), porém há maior destaque para *Escherichia coli* por ser a bactéria mais frequente em sua população de estudo (García et al., 2019). Em uma

revisão integrativa realizada por Santos e colaboradores, foi observada uma frequência similar entre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo estes, os patógenos mais frequentes em infecções de sítios cirúrgicos, com 7,7% cada.⁽²⁵⁾

Em relação ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, o presente estudo verificou que a bactéria *Escherichia coli* apresentou as taxas de resistência à ampicilina (80%), Ampicilina/sulbactam (60%), Cefuroxima (100%), Cefuroxima Axetil (100%), Cefoxitina (70%), ceftazidima (75%) e às quinolonas: Ciprofloxacina (65%) e Levofloxacina (60%). Um estudo por Iroha e colaboradores (2017) também evidenciou altas taxas de resistência aos antimicrobianos por *Escherichia coli* isoladas de ISC em pacientes ortopédicos. Dentre eles resistência às cefalosporinas (Ceftazidima e Cefoxitina com taxa de 96% e 97% respectivamente) e penicilina (Amoxilina, com taxa de 90%).⁽²⁶⁾

Outra grande preocupação em decorrência de ISC em ortopedia é a grande possibilidade de formação de biofilmes, que proporcionam uma maior proteção para as bactérias frente aos efeitos dos antimicrobianos e da atuação do sistema imune do hospedeiro no combate ao patógeno. Além disso, configuram um grande problema por proporcionarem maior dificuldade para isolamento e identificação das bactérias em amostras provenientes da ortopedia, devido ao fato de sua alta adesão às superfícies e necessidade de sonicação ou utilização de vórtex para sua liberação. A sonicação, por ser uma técnica mais sofisticada, está muitas vezes indisponível na maioria dos laboratório de microbiologia.⁽²⁷⁾

Jamal (2015) apresenta uma lista das principais bactérias associadas à formação do biofilme, dentre elas o *Staphylococcus aureus* é o quarto microrganismo mais comum em formação de biofilmes, perdendo apenas para *Staphylococcus epidermidis* (3^o), *Pseudomonas aeruginosa* (2^o) e *Escherichia coli* (1^o).⁽²⁸⁾ Os dados obtidos no presente estudo evidenciaram o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* figurando entre os mais prevalentes, o que indica alta possibilidade para formação de biofilmes nas amostras da população estudada, podendo os altos índices de casos negativos (46,5%) apresentados no estudo estar associados à dificuldade no isolamento devido ao mecanismo de formação de biofilme, além da disponibilidade apenas de vórtex para processar as amostras no laboratório do estudo. Em seu estudo Tampuz e colaboradores (2012) demonstraram que o emprego da sonicação apresenta melhor eficiência quando utilizado para o diagnóstico microbiológico em casos de infecção de próteses ortopédicas.⁽²⁹⁾

CONCLUSÃO

A partir de resultados obtidos podemos concluir que o *Staphylococcus aureus* continua sendo o principal causador

de infecções em sítios cirúrgicos de pacientes submetidos a procedimentos ortopédicos. O perfil de suscetibilidade antimicrobiana do *Staphylococcus aureus* apresentou uma taxa acima da média para resistência à meticilina, portanto MRSA multidroga resistente. *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram as bactérias Gram-negativas mais frequentes, sendo a *E. coli* altamente resistente às cefalosporinas e às penicilinas, evidenciando, assim, uma alta taxa de resistência bacteriana aos antimicrobianos na população estudada. As três bactérias citadas estão entre as mais comumente encontradas formando biofilmes, o que indica a necessidade de maiores cuidados de biossegurança pelos profissionais de saúde quanto ao risco de infecção devido a facilidade dessas bactérias em formar biofilmes em materiais e sítios cirúrgicos ortopédicos.

A análise do perfil microbiológico e suscetibilidade aos antimicrobianos é uma ferramenta que contribui na tomada de decisões quanto à antibioticoterapia mais adequada dentro da população em estudo. Além de ser importante para conscientizar sobre a necessidade da detecção de resistência bacteriana, evitando sua propagação e consequente melhor recuperação do paciente, com o uso adequado de antimicrobianos específicos para bactérias causadoras de infecções.

Abstract

Objective: Surgical site infections (SSIs) represent the third largest class of infections related to health care in Brazil. Risk of SSIs increase in patients undergoing orthopedic surgical procedures. Most orthopedic SSI are related to Gram-positive bacteria, among them *Staphylococcus ssp*. Other microorganisms commonly found are *Enterococcus*, as well as Gram-negative bacteria, especially *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. The present study aimed to identify the frequency of bacterial infections in surgical sites and antimicrobial susceptibility profile. **Methods:** Retrospective study analyzed microbiological results from patients attending the orthopedic trauma service in a public referral hospital from August 2016 to September 2018. **Results:** Of the 258 samples sent to the laboratory, 138 isolates were positive, 84% were from male patients and more than 31 species of bacteria were identified, with the most frequent being Gram positive *Staphylococcus aureus* (25,2%) and the second most frequent being *Enterococcus faecalis* (10.8%), followed by Gram negative bacteria *Escherichia coli* (9.9%) and *Pseudomonas aeruginosa* (9.9%). The antimicrobial susceptibility showed that 87.5% of *Staphylococcus aureus* isolates were MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) and presented sensitivity to vancomycin (96.4%) and Teicoplanine (98.2%). Considering gram-negative bacteria, this study showed that there was a technical tie between *Escherichia coli* (9.9%) and *Pseudomonas aeruginosa* (9.9%) followed by *Klebsiella pneumoniae* (8.1%). Regarding the antimicrobial susceptibility profile, *Escherichia coli* presented high resistance to cephalosporin and Penicillin. **Conclusion:** Microbiological profile and susceptibility to antimicrobials must be considered when determining the most appropriate antibiotic therapies to control hospital infections and decrease emergence of bacterial resistance.

Keywords

Surgical Wound Infection; Orthopedics; Staphylococcus aureus; Escherichia coli; Bacterial Drug Resistance

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência à saúde. Brasília: Anvisa, 2013[Internet]. disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/medidas_prevencao_infeccao_relacionada_assistencia_saude.pdf
2. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. *American Journal of Infection Control*. 2011 Dec 1;39(10):798–816.
3. Klompas M. Eight initiatives that misleadingly lower ventilator-associated pneumonia rates. *American Journal of Infection Control*. 2012 Jun 1;40(5):408–10.
4. Franco LMC, Ercole FF. Infecção de sítio cirúrgico em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas em um hospital público de Minas Gerais. *Revista Mineira de Enfermagem*. 2011;15(3):399–405.
5. Greene LR. Guide to the elimination of orthopedic surgery surgical site infections: An executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology elimination guide. *American Journal of Infection Control*. 2012 May 1;40(4):384–6.
6. Lima ALLM, Zumiotti AV, Uip DE, Silva J dos S. Predictable factors of infection in patients with open fractures in lower limbs. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2004 Mar;12(1):32–9.
7. Knobben BAS, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Evaluation of measures to decrease intra-operative bacterial contamination in orthopaedic implant surgery. *J Hosp Infect*. 2006 Feb;62(2):174–80.
8. Saadatian-Elahi M, Teysou R, Vanhems P. *Staphylococcus aureus*, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature review. *International Journal of Surgery*. 2008 Jan 1;6(3):238–45.
9. Al-Mulhim FA, Baragbah MA, Sadat-Ali M, Alomran AS, Azam MQ. Prevalence of Surgical Site Infection in Orthopedic Surgery: A 5-year Analysis. *Int Surg*. 2014;99(3):264–8.
10. Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv Exp Med Biol*. 2015;830:29–46.
11. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018 Jun 28;
12. Zoubos AB, Galanakos SP, Soucacos PN. Orthopedics and biofilm--what do we know? A review. *Med Sci Monit*. 2012 Jun;18(6):RA89-96.
13. Sanitária (Brasil) AN de V. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde [Internet]. 2004 [cited 2020 Feb 19]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf
14. Shetty N, Hill G, Ridgway GL. The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems, and pitfalls. *J Clin Pathol*. 1998 Apr;51(4):316–23.
15. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Apr 1;43(4):1716–21.
16. Negi V, Pal S, Juyal D, Sharma MK, Sharma N. Bacteriological Profile of Surgical Site Infections and Their Antibiogram: A Study From Resource Constrained Rural Setting of Uttarakhand State, India. *J Clin Diagn Res*. 2015 Oct;9(10): DC17–20.
17. Garcia FFS. Microorganisms associated with surgical site infections and orthopedic devices at the orthopedic spine service, orthopedics hospital. *MOJ Orthop Rheumatol*. 2019 Jan;2.
18. Santos L de F da S, Fonseca JMA da, Cavalcante BLS, Lima CM, et al. Epidemiologic of orthopedic trauma study in a public emergency. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2016 Dec;24(4):397–403.

19. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma [Internet]. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. 2005 [cited 2020 Feb 19]. Available from: <http://pesquisa.bvs.br/brasil/resource/pt/lil-441615>
20. Patted SM, Chinagudi S, Soragavi VR, Bhavi SB. The prevalence of MRSA infection in orthopaedic surgery in a Medical College Hospital: A 2-year analysis. Biomedical Research [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 19];24(1). Available from: <http://www.alliedacademies.org/abstract/the-prevalence-of-mrsa-infection-in-orthopaedic-surgery-in-a-medicalcollege-hospital-a-2year-analysis-1058.html>
21. Silva PM de F e, Feitosa RJP, Pimentel MC, Pereira H dos S, Catão RMR. Prevalence of hospital-acquired infections caused by Staphylococcus aureus and antimicrobial susceptibility profile. Journal of Nursing UFPE on line - ISSN: 1981-8963. 2013 Jul 21;7(8):5257–64.
22. Breves A, Miranda CAC, Flores C, Filippis I de, Clementino MM, Breves A, et al. Methicillin- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in health care workers and medical devices. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2015 Jun;51(3):143–52.
23. Lima MFP, Borges MA, Parente RS, Júnior RCV, Oliveira MED. Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. Revista Uningá Review [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2019 Feb 4];21(1). Available from: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1616>
24. Stone PW. Economic burden of healthcare-associated infections: an American perspective. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. 2009 Oct;9(5):417–22.
25. Santos G do C, Baylão AFG, Borges SCF, Silva LA da, Batista MH de J, Leite GR. Incidência e fatores de risco de infecção de sítio cirúrgico: Revisão integrativa. 1 [Internet]. 2015 Feb 25 [cited 2020 Feb 19];11(1). Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/ri/article/view/34142>
26. Iroha IR, Okoye E, Osigwe CA, Moses IB, Ejikegwu and Nwakaeze AE. Isolation, Phenotypic Characterization and Prevalence of ESBL-Producing Escherichia Coli and Klebsiella Species from Orthopedic Wounds in National Orthopedic Hospital Enugu (NOHE), South East Nigeria. Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 19];04(04). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/isolation-phenotypic-characterization-and-prevalence-of-esblproducing-escherichia-coli-and-klebsiella-species-from-orthopedic-woun-2376-0419-1000184.php?aid=93796>
27. Drago L, Toscano M. 2 - Biofilm formation and the biological response. In: Arts JJC, Geurts J, editors. Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs) [Internet]. Woodhead Publishing; 2017 [cited 2020 Feb 19]. p. 25–39. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081002056000021>
28. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology [Internet]. 2015 Jul 20 [cited 2020 Feb 20];4(3). Available from: <http://www.rroj.com/peer-reviewed/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections-61426.html>
29. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007 Aug 16;357(7):654–63.

Correspondência

Jair Figueredo dos Santos

Rua Arnóbio Marques, 310 - Santo Amaro

CEP 50100-130- Recife - PE – Brasil.

E-mail: jair.figueredo@outlook.com

Análise microbiológica de morangos frescos comercializados em Goiânia, Goiás

Microbiological analysis of fresh strawberries comercialized in Goiânia, Goiás

Verbenie Khrissy Machado
Nascimento Araújo¹
Elissa Dirane Estephan¹
Alessandra Marques Cardoso²

Resumo

Objetivo: O consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos pode levar a quadros de doenças transmitidas por alimentos. O presente estudo objetivou realizar uma análise microbiológica de morangos frescos (*Fragaria vesca*) comercializados em Goiânia, Goiás, pesquisando a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., em consonância com a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Métodos:** Foram analisadas 51 amostras de morangos frescos *in natura* no Laboratório Clínico da PUC Goiás, sendo 25 amostras oriundas de supermercados e 26 de comércio livre/rua, entre agosto/2019 e dezembro/2019, em diversos bairros das regiões Norte, Noroeste, Sul e Central do município de Goiânia, Goiás. Foram feitas culturas bacterianas nos ágaros *Eosin Methylene Blue* e *Salmonella-Shigella*, e identificados os isolados por provas bioquímicas clássicas. Como controle de qualidade, a cada bateria de experimentos, duas cepas bacterianas conhecidas, uma *Salmonella* spp. (Programa Nacional de Controle de Qualidade/PNCQ) e uma *E. coli* ATCC 25923, foram utilizadas. **Resultados:** Das 51 amostras analisadas, 5,9% (3/51) apresentaram positividade para o crescimento de *E. coli*, sendo estas amostras adquiridas no comércio livre/rua. Foi observada ausência de *Salmonella* spp. **Conclusão:** A grande maioria (94,1%) das amostras analisadas nesta pesquisa negativaram em relação à presença de *E. coli* e 100% negativaram para a presença de *Salmonella* spp., demonstrando que independente de adquiridos em comércio livre/rua ou em supermercados, os morangos encontravam-se microbiologicamente seguros para o consumo, de acordo com a legislação brasileira vigente.

Palavras-chave

Microbiologia de Alimentos; Coliformes; *Escherichia coli*; *Fragaria vesca*

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs), consideradas de grande importância mundial, ocorrem em decorrência da ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias e/ou suas toxinas, vírus e/ou outros parasitas. As avaliações microbiológicas devem ser realizadas nos alimentos para verificar a presença ou ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal durante o processo de cultivo, manuseio, armazenamento e transporte, até chegar ao consumidor. Estas análises determinam se o alimento atende à legislação vigente, a qual estabelece os parâmetros microbiológicos necessários para que o alimento seja considerado seguro para o consumo humano.⁽¹⁻⁵⁾

Coliformes fecais, segundo a RDC nº 375 de 17 de março de 2005, são bactérias Gram-negativas em forma de bacilos, oxidase negativa, caracterizadas pela atividade da enzima β -galactosidase. Podem crescer em meios contendo agentes tensoativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44°C a 45°C, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que não tenham sido contaminados por material fecal.⁽⁶⁾

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* apresenta grande diversidade patogênica, podendo ser dividida entre categorias que causam infecções intestinais e extraintestinais de EXPEC (*Extraintestinal pathogenic*

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

² Doutora e Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública com área de concentração em Microbiologia (UFG). Professora Adjunta da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, PUC Goiás. Biomédica da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás.

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

Recebido em 25/06/2020
Aprovado em 05/11/2021
DOI: 10.21877/2448-3877.202102023

E. coli). Das categorias que causam infecções intestinais encontram-se: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC).⁽⁷⁾

A EPEC é subdividida em duas categorias, sendo que ambas têm em comum a capacidade de produzir uma lesão característica no epitélio intestinal. A lesão mais conhecida e estudada é a A/E (Attaching/Effacing). A EHEC, que é um subgrupo das STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), causa desde casos assintomáticos, diarreia branda, até casos graves de colite hemorrágica. A EAEC costuma afetar mais adultos e crianças, se manifesta por diarreia secretora mucoide e aquosa, com o período de incubação curto, pouca febre e pouco ou nenhum vômito. A ETEC compreende a colonização da mucosa intestinal e a produção de enterotoxinas. A EIEC é um importante causador de diarreia em humanos. Clinicamente, a doença é acompanhada de febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarreia aquosa seguida de disenteria, consistindo em poucas fezes, muco e sangue.⁽⁷⁾

Também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a *Salmonella* spp. é um bacilo Gram-negativo não formador de esporos. Quando presente em diferentes ambientes, água potável e alimentos, isso se deve à contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores, sendo gastroenterite e febre tifoide as infecções mais importantes causadas por esse gênero.⁽⁷⁾

As duas espécies que causam doenças em humanos são *Salmonella enterica* e *Salmonella bengai*. A *S. enterica* é importante para a saúde pública e apresenta seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*. A sintomatologia divide-se em três grupos causadores de doenças, a saber: febre tifoide por *S. typhi* com sintomas muito graves, febre entérica por *S. paratyphi* com sintomas mais leves que a febre tifoide e as infecções entéricas ou salmoneloses com sintomas mais brandos.⁽⁸⁾

O morango, embora conhecido como fruto, é um receptáculo da flor original, onde as suas sementes são na realidade os seus frutos, sendo a *Fragaria* a mais comum. Devido às suas características físicas, o morango é bastante sensível e vulnerável às intempéries da natureza. Durante seu manuseio, do plantio à colheita, seu acondicionamento, transporte e distribuição em diferentes pontos de venda, até chegar aos consumidores, o morango pode ser exposto a vários tipos de contaminação, seja por vírus, bactérias, fungos e/ou parasitas. Assim, o consumo de morangos frescos pode representar uma fonte de microrganismos patogênicos, e quando esse alimento não é adequadamente higienizado pode ocasionar DTAs.^(4,9-12)

Considerando a necessidade da higiene sanitária e visando definir critérios e padrões microbiológicos para alimentos, a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de

2001, estabeleceu padrões por meio de análises capazes de determinar se os alimentos encontram-se adequados ao consumo humano. Neste contexto, este estudo objetivou realizar análise microbiológica de morangos frescos (*Fragaria vesca*) comercializados em Goiânia, Goiás, pesquisando a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., de acordo com a RDC nº 12.⁽⁵⁾

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 51 amostras de morangos (*Fragaria vesca*) frescos *in natura*, sendo 25 amostras oriundas de supermercados e 26 de comércio livre/rua.

A obtenção das amostras ocorreu entre os meses de agosto/2019 e dezembro/2019, em diversos bairros das regiões norte, noroeste, sul e central do município de Goiânia, Goiás. Os morangos foram transportados em sua própria embalagem (bandejas com plástico-filme), à temperatura ambiente, em tempo máximo de uma hora, para o Setor de Microbiologia do Laboratório Clínico da PUC Goiás (LAC/PUC-Goiás).

Para o processamento das amostras, 30 gramas de morangos foram assepticamente pesados e acondicionados em sacos plásticos estéreis com zíper, acrescidos de 50mL de água peptonada a 0,1%. Devidamente identificados, os sacos plásticos foram submetidos à agitação e maceração manual das amostras.

Após o processamento descrito, 200µL das amostras foram semeadas em placas contendo os ágaros *Eosin Methylene Blue* (EMB) e *Salmonella-Shigella* (SS), em duplicata. As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 36,5°C pelo período de 24 horas antes da realização das leituras em busca de unidades formadoras de colônias (UFC). Adicionalmente, como método alternativo para recuperação de *Salmonella* spp., 500µL das amostras foram inoculados em 5,0mL de água peptonada e incubadas à temperatura de 36,5°C por 48 horas. Após o período de incubação, 200µL foram semeados em placas de ágar SS e incubadas à temperatura de 36,5°C por 24 horas, antes da realização das leituras em busca de unidades formadoras de colônias.

As colônias suspeitas de *E. coli* foram submetidas a provas bioquímicas manuais clássicas para identificação e confirmação: Tríplice açúcar e ferro (TAF), Motilidade, Indol e Ornitina (MIO), Citrato, Ureia, Lisina, Fenilalanina, Caldo Voges-Proskauer e Caldo Malonato.

Foram empregadas como controle de qualidade, a cada bateria de experimentos, duas cepas bacterianas conhecidas, uma *Salmonella* spp. oriunda do Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ e uma *Escherichia coli* ATCC 25923, gentilmente cedidas pelo LAC/PUC-Goiás.

Em relação aos aspectos ético-legais, como o presente estudo não utilizou amostras humanas e/ou animais, a submissão prévia a um comitê de ética em pesquisa foi dispensada.

RESULTADOS

O mapa das regiões do município de Goiânia, Goiás, apresentado na Figura 1 mostra as regiões onde foram adquiridas as amostras de morango: norte, noroeste, sul e central, ou seja, locais de fácil acesso e onde o fruto tem maior comercialização.

Conforme apresentado na Tabela 1, das 51 amostras analisadas, 5,9% (3/51) apresentaram positividade para o crescimento de *E. coli*, sendo estas amostras adquiridas no comércio livre/rua, portanto, não foi observada positividade nas amostras oriundas de supermercado.

Nas três amostras de comércio livre/rua em que a presença de *E. coli* foi detectada, observou-se a seguinte estimativa de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g): amostra A = 1.325 UFC/g, amostra B = 1.125 UFC/g e amostra C = 925 UFC/g. Foi verificada ausência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

DISCUSSÃO

Esta pesquisa detectou presença de *E. coli* em 5,9% das amostras analisadas. Entretanto, no estudo de Dziejzinska *et al.*⁽¹⁰⁾ houve maior positividade desse microrganismo quando empregada a técnica de biologia molecular reação em cadeia da polimerase (PCR) nas análises, revelando

44,2% de positividade, enquanto as culturas mostraram positividade em 9,0% das amostras.

A Portaria da ANVISA nº25/76, de 09/11/1997, regulamenta a utilização do ozônio na forma gasosa ou líquida como conservante de alimentos no Brasil, pois além de apresentar ação antimicrobiana, dispõe de propriedades conservantes de alimentos, como o morango.⁽¹³⁾ No presente estudo não houve detecção de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas, corroborando com o estudo de Alves *et al.* (2019),⁽¹⁴⁾ que também não detectou *Salmonella* spp. em amostras de morango submetidas à análise microbiológica. Entretanto, é importante ressaltar que no trabalho de Alves *et al.* não foi possível afirmar que o uso do ozônio foi o responsável pela inativação da *Salmonella* spp., pois tanto morangos submetidos à ozonização quanto aqueles que não foram submetidos apresentaram ausência de *Salmonella* spp.

Segundo a RDC nº12 da ANVISA, de 2001,⁽⁵⁾ o padrão microbiológico aceitável em morangos frescos devem ser: ausência para *Salmonella* spp. e, no máximo, 2×10^3 colônias de *E. coli* por grama de morango. Nesta pesquisa foi revelada ausência de *Salmonella* spp. e presença de *E. coli* em três amostras adquiridas em comércio livre/rua com contagem de colônias inferior a 2×10^3 colônias por grama de morango. Portanto, nossos achados atendem à legislação vigente, indicando que os morangos estão microbiologicamente adequados para o consumo.

Tabela 1 - Detecção de *Escherichia coli* em morangos comercializados em Goiânia, Goiás.

Local de aquisição dos morangos	Nº de amostras analisadas	Nº absoluto de amostras positivas para <i>E. coli</i>	Percentual de amostras positivas para <i>E. coli</i>
Supermercado	25	0	0,0%
Comércio livre/rua	26	03	11,5%
Total	51	03	5,9%

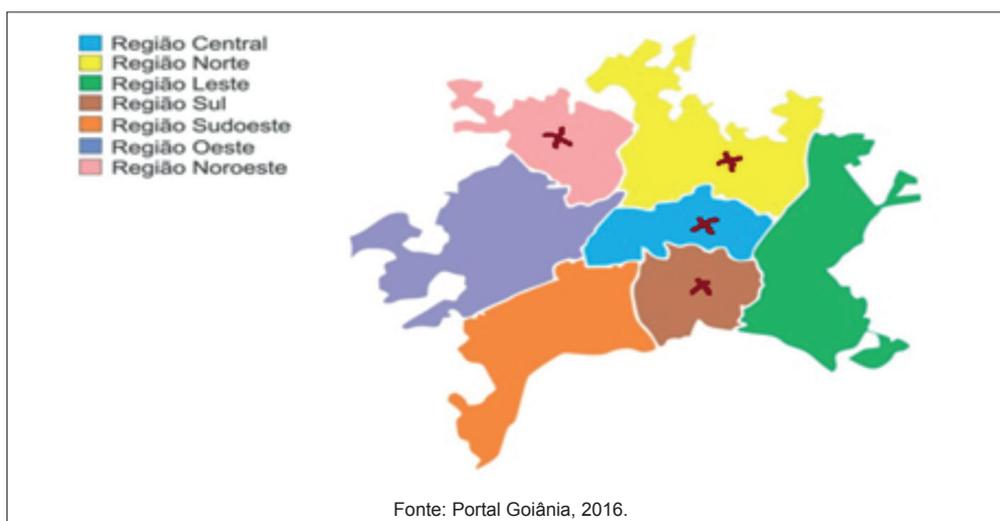


Figura 1. Mapa das regiões do município de Goiânia, Goiás. As regiões demarcadas demonstram onde as amostras foram obtidas para análise.

A principal estratégia⁽¹⁵⁾ é que para se controlar a qualidade de um produto, as medidas mais eficazes são a adoção de medidas preventivas e detecção e rápida correção de falhas no processamento. A ênfase na qualidade microbiológica atenta-se à quantidade e ao tipo dos microrganismos envolvidos. Neste processo, a higiene é fator importante, uma vez que ambiente, manipuladores e superfícies também podem ser fontes de contaminação. Além disso, fatores intrínsecos ao alimento, como pH e atividade da água, bem como fatores extrínsecos ao alimento, como temperatura, umidade relativa e presença de gases, vão determinar se a qualidade pode ser considerada ótima ou limitante, fatores estes que interferem na multiplicação de microrganismos patogênicos e causadores de DTAs.⁽¹⁾

No quesito qualidade dos alimentos, especificamente no caso dos morangos, é necessário dispensar atenção ao processo da sua produção, o que implica os cuidados no cultivo, observando que a terra, a água de irrigação, o adubo e os defensivos agrícolas podem impactar na contaminação microbiana. O fato das amostras analisadas nessa pesquisa, em sua grande maioria (94,1%), negativarem em relação à presença de *E. coli* e 100% negativarem para a presença de *Salmonella* spp. demonstrou que, independente de adquiridos em comércio livre/rua ou em supermercados, os morangos encontravam-se microbiologicamente seguros para o consumo.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a presente pesquisa revelou que 100,0% das amostras analisadas atenderam os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira vigente, tendo sido detectado baixo percentual (5,9%) de contaminação das amostras de morangos por *E. coli* e ausência de *Salmonella* spp., dados importantes para a segurança alimentar dos consumidores de morango da cidade de Goiânia, Goiás.

Abstract

Objective: The consumption of food contaminated by pathogenic microorganisms can cause Foodborne Diseases. The present study aimed to perform a microbiological analysis of fresh strawberries (*Fragaria vesca*) marketed in Goiânia, Goiás, researching the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., in line with RDC No. 12, of January 2, 2001. **Methods:** They have analyzed 51 samples of fresh strawberries in natura at the Clinical Laboratory of PUC Goiás, 25 samples from supermarkets and 26 from free trade/street, between August/2019 and December/2019, in several neighborhoods in the North, Northwest, South, and Central regions county of Goiânia, Goiás. Bacterial cultures cultivated on Eosin Methylene Blue and Salmonella-Shigella agar, and identification of the isolates by standard biochemical tests. As a quality control, in each battery of experiments, two known bacterial strains, one *Salmonella* spp. (National Quality Control Program/PNCQ) and an *E. coli* ATCC 25923 was used. **Results:** Of the 51 samples analyzed, 5.9% (3/51) were positive for the growth of *E. coli*, these samples were acquired in free/street commerce. Absence of *Salmonella* spp. **Conclusion:** The majority (94.1%) of the samples analyzed in this research were negative concerning the presence of *E. coli*, and 100% were negative for the presence of *Salmonella* spp.,

demonstrating that independent of being acquired in free trade/street or supermarkets, the strawberries analyzed were microbiologically safe for consumption, following the current Brazilian legislation.

Keywords

Foodborne Microbiology; Coliforms; *Escherichia coli*; *Fragaria vesca*

REFERÊNCIAS

1. Franco BDGM., Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu; 2005. p.27-171.
2. Santos TBA, Silva N, Junqueira VCA, Pereira JL. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. Brazilian J Food Technol. 2010;13(02):141-146.
3. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Vigilância Epidemiológica Das Doenças Transm por Aliment. 2015.
4. ANVISA. Doenças Transmitidas por Alimentos. Ministério da Saúde, Governo Federal. 2010.
5. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. RDC N°12. 2001.
6. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução Conama N° 357, de 17 de Março de 2005* (Retificada). 2005.
7. Trubalsi LR, Alterthum. Microbiologia. 5ª edição São Paulo, Atheneu. 2008. p.271-307, 329.
8. Shinohara NKS, De Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima-Filho JL. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Ciência & Saúde Coletiva. 2008;13(5):1675-83.
9. Darrow GM. The Strawberry: History, Breeding, and Physiology [Internet]. 1966. Available from: <https://web.archive.org/web/20101204163252/http://www.nal.usda.gov/pgdic/Strawberry/book/bokfive.htm#>
10. Vasickova P, Hrdy J, Slany M, Babak V, Moravkova M. Foodborne bacterial, viral, and protozoan pathogens in field and market strawberries and environment of strawberry farms. Journal of Food Science. 2018;83(12):3069-75.
11. Yoon Y, Kim K, Nam M, Shim W-B, Ryu J-G, Kim D-H, You O-J, Chung D-H. Microbiological assessment in strawberry production and recommendations to establish a good agricultural practice system. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(12):1511-9.
12. U.S. Department of Agriculture, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy Release [Internet]. abril, 2018. [cited 2019 Jun 5]. Available from: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2385?fgcd=&manu=&facet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=strawberry+raw&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>
13. Coelho CCS, Freitas-Silva O, Campos RS, Bezerra VS, Cabral LMC. Ozonation as post-harvest technology in conservation of fruits and vegetables: A review. Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient. 2015;19(4):369-75.
14. Alves H, Alencar ER, Ferreira WFS, Silva CR, Ribeiro JL. Aspectos microbiológicos e físico-químicos de morango exposto ao gás ozônio em diferentes concentrações durante o armazenamento. Braz. J. Food Technol. 2019;22:1-12.
15. Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. Rev. Saúde Pública. 1995;29(4):290-4.

Correspondência

Alessandra Marques Cardoso
Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Avenida Universitária, 1440, Setor Universitário.
CEP 74.605-010, Goiânia/GO, Brasil.
E-mail: alemarquespuc@gmail.com

A importância da liberação da estimativa da taxa de filtração glomerular junto do resultado da creatinina sérica nos laudos

The importance of the glomerular filtration rate estimation combines with the serum creatinine result in the reports

Flávia Martinello¹

Lenilza Mattos Lima¹

Mauren Isfer Anghebem²

DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) é uma síndrome clínica decorrente de uma lesão renal que progride no decorrer de vários meses a anos. O diagnóstico é realizado pela medida da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), pelo exame de urina e pesquisa de albuminúria, e por exame de imagem dos rins.^(1,2)

Baseado em um mínimo de dois resultados de taxa de filtração glomerular (TFG), obtidos com intervalo de pelo menos 3 meses, a DRC é classificada em cinco estágios (Figura 1). À medida que a TFG cai para menos de 60 mL/min, as manifestações sistêmicas e as complicações da DRC tornam-se cada vez mais evidentes. A DRC de estágio V (TFG < 15 mL/min) representa uma doença renal em estágio terminal com indicação de terapia de substituição renal.^(1,3)

Classificação da doença renal crônica				Albuminúria		
				A1	A2	A3
				Normal ou levemente aumentada < 30 mg/dia	Moderadamente aumentada 30 - 300 mg/dia	Severamente aumentada > 300 mg/dia
TFG	G1	Normal ou alta	> 90 ml/min	G1 A1	G1 A2	G1 A3
	G2	Levemente reduzida	60 - 89 ml/min	G2 A1	G2 A2	G2 A3
	G3a	Leve a moderadamente reduzida	45 - 59 ml/min	G3a A1	G3a A2	G3a A3
	G3b	Moderada a severamente reduzida	30 - 44 ml/min	G3b A1	G3b A2	G3b A3
	G4	Severamente reduzida	15 - 29 ml/min	G4 A1	G4 A2	G4 A3
	G5	Falência renal	< 15 ml/min	G5 A1	G5 A2	G5 A3

■ Baixo risco	Usualmente sem sintomas
■ Risco moderado	Possíveis complicações
■ Risco elevado	Complicações evidentes
■ Risco muito elevado	

Figura 1. Estágios da doença renal crônica (DRC), manifestação de sintomas baseados na estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) e riscos da doença.⁽⁴⁾

¹ Profa do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

² Profa do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná e da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Instituição: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

DOI: 10.21877/2448-3877.202100020

A creatinina sérica é o exame laboratorial mais amplamente utilizado para avaliar a função renal. Como subproduto do metabolismo da creatina e fosfo-creatina no músculo esquelético, a creatinina é gerada a uma taxa constante e conseqüentemente, liberada de forma constante na circulação sanguínea. Como a creatinina é predominantemente eliminada por filtração glomerular, com secreção de apenas uma fração mínima pelas células tubulares, a concentração sérica de creatinina apresenta uma associação inversa com a função renal. Cada elevação correspondente ao dobro da concentração sérica de creatinina significa uma redução aproximada de 50% da TFG.^(1,3)

Apesar da ampla aceitação como medida da função dos rins, a creatinina sérica apresenta algumas limitações que precisam ser reconhecidas. Como a produção de creatinina ocorre em função da massa muscular, a concentração sérica considerada “normal” deve ser interpretada no contexto de cada paciente. A concentração sérica de creatinina da ordem de 1,00 mg/dL, considerada dentro do intervalo de referência pela maioria dos laboratórios, pode, na verdade, estar aumentada (ou seja, > 1,00 mg/dL) em um paciente com massa muscular reduzida, como comumente ocorre no envelhecimento, na doença hepática ou em outra comorbidade associada ao desgaste muscular.⁽¹⁾

Com a progressão da DRC, a proporção relativa de creatinina secretada pelos rins pode sofrer aumento de até 30%. Nesse caso, a concentração sérica de creatinina deixa de apresentar uma boa associação com a TFG, levando à superestimativa da verdadeira função renal. Além disso, certos medicamentos interferem na secreção tubular da creatinina (Quadro 1) e, desta forma, limitam a utilidade da concentração sérica de creatinina para fins de associação com a função renal nessas circunstâncias.^(1,3)

DETERMINAÇÃO LABORATORIAL DA CREATININA SÉRICA

A creatinina pode ser medida por métodos químicos e enzimáticos, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*) e espectrometria de massa com diluição de isótopos (ID-MS, do inglês *Isothope Dillution Mass Spectometry*), sendo este último o método de referência. O método mais comum é o baseado na reação de Jaffé, onde o picrato alcalino reage com a creatinina em meio alcalino, formando um complexo amarelado de picrato de creatinina. Este método pode ser afetado pela concentração de ácido pícrico, pH, comprimento de onda, temperatura, e cromógenos não creatinínicos como bilirrubina ou acetoácidos. Alguns medicamentos também podem interferir positivamente (lidocaína, cimetidina, cefalosporinas e metildopa) ou negativamente (dipirona) na reação, conforme a plataforma analítica utilizada.⁽⁵⁻⁷⁾

Quadro 1 - Situações em que a creatinina sérica não prediz com acurácia a TFG.⁽¹⁾

Situações que superestimam a TFG
Síndrome nefrótica (secreção tubular aumentada)
IRA com elevação da creatinina
Supercrescimento bacteriano intestinal (excreção extrarrenal de creatinina)
Condições de baixa massa muscular
Doença hepática crônica
Pacientes idosos
Obesidade
Doença sistêmica associada à condição catabólica
Desnutrição
Situações que subestimam a TFG
IRA em fase de recuperação (declínio da creatinina)
Fármacos que inibem a secreção tubular
Trimetoprima
Cimetidina
Dronedarona
Fatores que interferem no ensaio de creatinina
Acetoacetato
Cefoxitina
Flucitossina
Ingestão de grande quantidade de carne cozida (aumento da creatinina exógena)

IRA = insuficiência renal aguda; TFG = taxa de filtração glomerular

Em 2006, um Grupo de Trabalho do NKDEP (do inglês, *National Kidney Disease Education Program*) relatou necessidades de padronização nas medições de creatinina sérica e colaborou com a Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC, do inglês, *The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) para a realização de análises mais precisas com menor variação interlaboratorial.⁽⁸⁾

A metodologia enzimática, embora de maior custo, confere uma maior especificidade à determinação do analito, pois elimina a interferência de proteínas plasmáticas e outros cromógenos comumente observados com os métodos diretos que utilizam a reação de Jaffé. Desta forma, não é necessário fazer cálculos para minimizar outros interferentes. A determinação de creatinina enzimática utiliza as enzimas creatinina amidohidrolase, creatina amidinohidrolase e sarcosina oxidase, em conjunto com a reação de Trinder. Os reagentes são rastreáveis ao material de referência SRM 914 do NIST (*National Institute of Standards and Technology*), tornando-o equivalente ao método ID-MS, segundo recomendação do NKDEP.⁽⁹⁾

TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Uma avaliação mais precisa da função renal pode ser obtida pela TFG, que é a taxa de fluxo, em mililitros por minuto (depuração) do plasma de substâncias que são filtradas livremente pelas membranas de glomérulos sem sofrer reabsorção ou secreção tubular renal.^(3,10)

O método padrão-ouro para avaliar a TFG é a depuração renal da inulina, um polímero da frutose com uma unidade de glicose terminal de origem vegetal. No entanto, como uma substância exógena, a inulina não é adequada para a prática diária, necessitando de injeção endovenosa e de difícil metodologia laboratorial. Apesar de parte da creatinina ser secretada, a depuração (*clearance*) da creatinina, na urina de 24 horas, é um marcador conveniente e barato para estimar a TFG, pois é medida no soro e na urina, porém, é afetada pela idade, sexo, exercício físico, massa muscular e dieta.⁽¹⁰⁾ Além disto, é necessário garantir que a coleta de urina seja realizada somente em 24 horas, uma vez que as coletas mais ou menos prolongadas resultam, respectivamente, em super ou subestimação da TFG. Entretanto, considerando a dificuldade, a demora e imprecisão da coleta de urina de 24 horas por questões práticas, por exemplo, as pessoas que passam longos períodos fora de casa precisam levar consigo o frasco de coleta, a depuração da creatinina frequentemente não é solicitada na rotina clínica.⁽¹⁾

Estudos mais recentes têm proposto a cistatina C como um marcador endógeno da TFG superior à creatinina. Ela é uma proteína sintetizada a uma taxa constante em todas as células nucleadas, filtrada livremente nos glomérulos e reabsorvida e catabolizada nos túbulos proximais. A sua concentração sérica é, portanto, dependente da filtração glomerular, o que faz dessa substância um bom marcador da TFG, sem necessidade da medida urinária. No entanto, limitações relacionadas ao custo, à disponibilidade de métodos de medida, aos riscos e ao tempo despendido nesses processos, fazem com que a cistatina C não seja ainda amplamente utilizada na prática clínica.^(10,11)

Por essas razões, mesmo com as limitações na prática clínica, a concentração de creatinina sérica é utilizada comumente para estimar a TFG.

Tendo em vista as limitações mencionadas anteriormente para a medida da TFG, algumas equações foram derivadas para fornecer uma estimativa da TFG (eTFG) como marcador indireto da função renal.

Equação da Taxa de Filtração Glomerular⁽¹⁰⁾

$$\text{Depuração de creatinina (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = \frac{[\text{CrU/CrS}] \times [\text{volume de urina em 24 horas (mL)/1440}] \times [1,73/\text{ASC}]}{1}$$

onde, Cr: creatinina (mg/dL); U: urina; S: soro; ASC: área de superfície corporal = $[\text{peso}/(\text{altura(m)}^2)]$.

Para essa estimativa, toma-se como base em diversos fatores clínicos e demográficos, incluindo idade, sexo, peso corpóreo e etnia (Tabela 1).^(1,3,10)

Tabela 1 - Estimativa da Taxa de Filtração Glomerular por equações

MÉTODO PARA ESTIMAR A TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR	EQUAÇÃO
Adultos	
Cockcroft-Gault ¹⁰ (mL/min/1,73 m ²)	eTFG = [(140-idade) x peso corporal(kg) x 0,85 (se mulher)] / CrS x 72
MDRD ¹² com 4 variáveis (mL/min/1,73 m ²) para os laboratórios que usam métodos com calibradores NÃO rastreáveis ao ID-MS	eTFG = 186 x (CrS) ^{-1,154} x (idade) ^{-0,203} x 0,742 (se mulher) x 1,212 (se negro)
MDRD ¹² com 4 variáveis (mL/min/1,73 m ²) para os laboratórios que usam métodos com calibradores rastreáveis ao ID-MS	eTFG = 175 x (CrS) ^{-1,154} x (idade) ^{-0,203} x 0,742 (se mulher) x 1,212 (se negro)
CKD-EPI ¹² (mL/min/1,73 m ²) somente para os laboratórios que usam métodos com calibradores rastreáveis ao ID-MS	
Mulheres negras com creatinina ≤ 0,7	eTFG = 166 x (CrS/0,7) ^{-0,329} x (0,993) ^{idade}
Mulheres negras com creatinina > 0,7	eTFG = 166 x (CrS/0,7) ^{-1,209} x (0,993) ^{idade}
Homens negros com creatinina ≤ 0,9	eTFG = 163 x (CrS/0,9) ^{-0,411} x (0,993) ^{idade}
Homens negros com creatinina > 0,9	eTFG = 163 x (CrS/0,9) ^{-1,209} x (0,993) ^{idade}
Demais mulheres com creatinina ≤ 0,7	eTFG = 144 x (CrS/0,7) ^{-0,329} x (0,993) ^{idade}
Demais mulheres com creatinina > 0,7	eTFG = 144 x (CrS/0,7) ^{-1,209} x (0,993) ^{idade}
Demais homens com creatinina ≤ 0,9	eTFG = 141 x (CrS/0,9) ^{-0,411} x (0,993) ^{idade}
Demais homens com creatinina > 0,9	eTFG = 141 x (CrS/0,9) ^{-1,209} x (0,993) ^{idade}
Crianças e adolescentes (menores de 18 anos)	
Schwartz ¹³ (mL/min/1,73 m ²) para os laboratórios que usam métodos com calibradores rastreáveis ao ID-MS	eTFG = (0,41 x altura (cm)) / CrS
Counaham& Barratt ¹⁴ (mL/min/1,73 m ²) para os laboratórios que usam métodos com calibradores NÃO rastreáveis ao ID-MS	eTFG = (0,43 x altura (cm)) / CrS

Cr: creatinina (mg/dL); U: urina; S: soro; Idade: em anos; MDRD: do estudo *Modification of Diet in Renal Disease*; CKD-EPI: do estudo *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*.

Todos os pacientes que se encontram no grupo de risco para DRC devem medir a creatinina sérica e ter a sua TFG estimada.⁽²⁾

Tem sido de grande utilidade relatar de forma rotineira a eTFG nos laudos laboratoriais, assim como a indicação da equação utilizada, acompanhada da concentração sérica de creatinina com duas casas decimais. Essa forma de reportar traz como vantagem o potencial de detectar a doença renal ainda inicial, durante os estágios clinicamente silenciosos, quando ainda há oportunidades de intervenção para retardar a progressão da doença.^(1,4)

Entretanto, as equações para eTFG têm limitações. Primeiro, a medida da TFG, via depuração de creatinina de 24 horas ou estimativa com fórmula, baseia-se em uma condição fisiológica estável, com concentração sérica de creatinina estável. No entanto, alguns fatores podem influenciar a função renal em pacientes hospitalizados, tais como a instabilidade hemodinâmica e hipoperfusão renal, alterações no volume intravascular e toxicidade renal pelo tratamento medicamentoso. Assim, quando a concentração sérica de creatinina está se modificando, a eTFG perde a utilidade como ferramenta para determinação acurada da função renal real. Quando a concentração sérica de creatinina estiver em elevação aguda, a eTFG superestima a TFG real. Ao contrário, quando a creatinina estiver em queda, a função renal é subestimada.⁽¹⁾

Para estimar a TFG, o Ministério da Saúde recomenda o uso da fórmula MDRD simplificada (com 4 variáveis) ou da CKD-EPI.⁽²⁾ No entanto, o KDIGO (do inglês *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) recomenda o uso da equação CKD-EPI.⁽⁴⁾

A equação de Cockcroft-Gault, cujo nome faz referência aos dois pesquisadores que a desenvolveram, foi a primeira fórmula amplamente utilizada para cálculo da eTFG e foi deduzida a partir de resultados de 249 homens brancos hospitalizados e com função renal normal. Além de não representar a população geral, a equação não considera a superfície corporal, apenas a massa corporal, sendo inadequada para pacientes obesos, além de poder subestimar a TFG real em idosos.^(1,2) Ainda, a equação foi desenvolvida utilizando um ensaio de Jaffé desatualizado para a medida de creatinina e deve ser reavaliada quando calculada com métodos de creatinina com calibração rastreável.⁽³⁾

As equações MDRD, do estudo *Modification of Diet in Renal Disease*, foram derivadas a partir de estudos epidemiológicos de coorte que incluiu, predominantemente, indivíduos brancos (88%) não diabéticos com DRC, dificultando a generalização dessas equações para pacientes diabéticos, indivíduos de diferentes etnias e transplantados. A equação MDRD completa é pouco utilizada, pois envolve a análise de três parâmetros laboratoriais, envolvendo maior custo.^(1,3) A correção para a etnia negra refere-se à população negra

americana, enquanto outras nacionalidades vêm também validando a fórmula. Porém, a fórmula do MDRD abreviada com “quatro variáveis” tem sido recomendada, devido a seu desempenho ser igualmente satisfatório quanto a equação inicial³. Essa fórmula não deve ser utilizada para eTFG maiores que 60 mL/min/1,73m².

A equação CKD-EPI, do estudo *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, é uma variação da fórmula do MDRD, obtida a partir de conjuntos de dados de 10 estudos, em um total de 8.254 participantes, incluindo indivíduos com e sem DRC. Apesar de usar as mesmas quatro variáveis, comparativamente, apresenta melhor desempenho e previsão de risco. Porém, pode superestimar a TFG em pacientes que estão extremamente abaixo do peso e subestimar em pacientes com obesidade mórbida ou com diabetes.⁽³⁾

Por fim, uma única equação é improvável que funcione igualmente bem, com a mesma acurácia, em casos de pacientes com reduções normais ou leves da TFG, em todas as populações.^(1,3) No entanto, como uma medida de creatinina sérica isolada tem um risco considerável para classificar erroneamente a função renal, a eTFG deve ser rotineiramente calculada por laboratórios, pelas equações para adultos e para crianças, e reportada juntamente com o resultado da concentração de creatinina sérica.⁽¹⁵⁾

Contudo, o método utilizado para a determinação da creatinina deve ser equivalente ao utilizado no estudo que desenvolveu a equação. Esse tipo de cuidado é essencial com vistas à precisão e à comparabilidade dos resultados. Assim, recomenda-se a calibração dos métodos de creatinina, tanto enzimáticos quanto de Jaffé, segundo o método de referência, ou seja, deve constar nas informações do fabricante do conjunto diagnóstico (*kit*) que o calibrador é rastreável ao método ID-MS. Caso essa informação não conste no reagente, deve-se procurá-la com o fabricante. Métodos com calibradores não rastreáveis ao método de referência ID-MS geram resultados aproximadamente 10% acima do valor real.^(4,13)

Como os cálculos da eTFG incluem inúmeras variáveis, eles se tornam complexos para a rotina do laboratório e requerem um relativo conhecimento de matemática ou um programa de computação capaz de realizá-lo, ou ainda acesso às páginas eletrônicas ou aplicativos que disponibilizam as fórmulas gratuitamente.

Além disto, para resultados da eTFG abaixo de 60 mL/min/1,73 m², deve-se reportar o número arredondado para um número inteiro (ex. “32 mL/min/1,73 m²”). Resultados de eTFG acima desse valor devem ser reportados apenas como ≥ 60 mL/min/1,73 m², e não o número exato. Há três razões para essas recomendações:

- Diferenças interlaboratoriais na calibração dos ensaios de creatinina e a imprecisão das medidas têm maior impacto na faixa próxima do normal e, portanto, levam a resultados ≥ 60 mL/min/1,73 m² inacurados.

- Todas as equações são menos acuradas para pessoas com função renal normal ou função pouco alterada.
- Valores de eTFG abaixo de 60 mL/min/1,73 m² têm mais implicações clínicas para a classificação da função renal que valores acima desse nível.⁽¹⁵⁾
- Como o valor de referência pode ser utilizado >60 mL/min/1,73 m² como desejável para indivíduos > de quatro meses de idade.^(4,16)

RECOMENDAÇÕES DA SBAC

- ▶ Utilizar duas (casas) decimais para expressar o resultado de creatinina;
- ▶ Utilizar metodologia de creatinina rastreável ao método ID-MS;
- ▶ Escolher uma fórmula para o cálculo da estimativa da filtração glomerular (eTFG) para adultos e outra para crianças, de acordo com a metodologia da creatinina e de acordo com a preferência da equipe médica, caso seja laboratório de atendimento hospitalar;
- ▶ Reportar a e TFG nos laudos sempre que a creatinina for solicitada;
- ▶ Como normalmente os laboratórios não têm o registro da etnia dos pacientes, liberar a estimativa tanto para pessoas de etnia negra quanto para pessoas não negras;
- ▶ Reportar estimativas da TFG maiores ou iguais a 60 mL/min/1,73 m² apenas como ≥ 60 mL/min/1,73 m² e não o número exato. Abaixo de 60 mL/min/1,73 m², deve-se reportar o número arredondado para um número inteiro.

REFERÊNCIAS

1. Durvasula RV, Himmelfarb J. Chronic renal failure and dialysis. *ACP Medicine*. 2011, 1-17.
2. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p.: 37 p.: il. ISBN 1. Doença Renal Crônica. <http://www.saude.gov.br/bvs>.
3. Brito TNS, Oliveira ARA, Silva AKC. Taxa de filtração glomerular estimada em adultos: características e limitações das equações utilizadas. *Rev Bras An Clin*. 2016, 48(1):7-12.
4. KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes. CKD Work Group 2012. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Inter. Suppl*. 2013; 3:1–150.
5. Bagnoud MA, Reymond JP. Interference of Metamizol (Dipyron) on the Determination of Creatinine with the Kodak Dry Chemistry Slide Comparison with the Enzymatic Method from Boehringer. *Clin Chem Lab Med*. 1993; 31(11):753-758. doi: 10.1515/cclm.1993.31.11.753
6. Letellier G, Desjarlais F. Analytical interference of drugs in clinical chemistry: II--The interference of three cephalosporins with the determination of serum creatinine concentration by the Jaffe reaction. *Clin Biochem*. 1985; 18(6):352-6. doi: 10.1016/s0009-9120(85)80074-6.
7. Kumar D, Singh S, Kaur S, Kumari M, Bhattacharyya R, Banerjee D. Rifampicin and isoniazid behave as non-creatinine chromogens and interfere with Jaffe's reaction: A phenomenon with the potential to give a false-positive result in creatinine estimation. *Indian J Tuberc*. 2020;67(2):253-256. doi: 10.1016/j.ijtb.2019.08.012.
8. Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, Hostetter T, Levey AS, Panteghini M, Welch M, Eckfeldt JH; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem*. 2006; 52(1):5-18. doi: 10.1373/clinchem.2005.0525144.
9. Küme T, Sağlam B, Ergon MC, Sişman AR. Evaluation and comparison of Abbott Jaffe and enzymatic creatinine methods: Could the old method meet the new requirements? *J Clin Lab Anal*. 2018; 32:e22168. doi: 10.1002/jcla.22168
10. Akpınar K, Aslan D, Fenkçi SM. Avaliação da taxa de filtração glomerular estimada com base na creatinina C em nefropatia diabética. *Braz J Nephrol*. 12 Feb 2021.
11. Barbosa FC, Ferreira TCA, Salgado-Filho N. Avaliação do Desempenho das Equações de Cockcroft-Gault e do Estudo "Modification of Diet in Renal Disease" em Transplantados Renais. *J Bras Nefrol* 2008;30(3):205-12.
12. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW, Lente FV. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for Estimating Glomerular Filtration Rate with Standardized Serum Creatinine Values. *Clin Chem*. 2007; 53(4):766–772.
13. NIDDK. Home \ Health Information \ For Health Professionals \ Clinical Tools & Patient Management \ Kidney Disease for Health Professionals \ Laboratory Evaluation of Kidney Disease \ Glomerular Filtration Rate (GFR) \ Calculators. Disponível em <https://www.niddk.nih.gov/health-information/professionals/clinical-tools-patient-management/kidney-disease/laboratory-evaluation/glomerular-filtration-rate> Acesso em 30/06/2021.
14. Grubb A, Nyman U, Björk J, Lindström V, Rippe B, Sterner G, Christensson A. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children. *Clin Chem*. 2005; 51(8):1420-31.
15. NIDDK. Home \ Health Information \ For Health Professionals \ Clinical Tools & Patient Management \ Kidney Disease for Health Professionals \ Laboratory Evaluation of Kidney Disease \ Glomerular Filtration Rate (GFR) \ Estimating GFR. Disponível em <https://www.niddk.nih.gov/health-information/professionals/clinical-tools-patient-management/kidney-disease/laboratory-evaluation/glomerular-filtration-rate/estimating>. Acesso em 12/07/2021.
16. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22(11):1839-48. doi: 10.1007/s00467-006-0358-1.

Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas sobre o reporte da estrutura denominada *Urbanorum* spp. em amostras de fezes - 2021

Position of the Brazilian Society of Clinical Analyses on the report of the structure called *Urbanorum* spp. in stool samples - 2021

José Antonio Tesser Poloni¹

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira²

Flávia Martinello³

Mauren Isfer Anghebem⁴

Paulo Murillo Neufeld⁵

Tiana Tasca⁶

Lenilza Mattos Lima⁷

INTRODUÇÃO

Em 1994, Francisco Tirado Santamaría, da Universidad Industrial de Santander na Colombia, descreveu uma estrutura observada em amostras de fezes humanas como sendo um microrganismo. Classificou a estrutura como um protozoário similar as amebas, com características particulares, e a nomeou *Urbanorum* spp.⁽¹⁾

Anos após sua publicação, alguns relatos semelhantes foram divulgados, associando a presença da estrutura a quadros clínicos intestinais.⁽²⁻⁵⁾

O QUE É A ESTRUTURA DENOMINADA *URBANORUM* SPP.

Para melhor conhecermos este elemento realizamos alguns testes com amostras fecais contendo a referida estrutura e verificamos que:

a) A estrutura é observada tanto encapsulada (membrana intacta) quanto “emitindo projeções” após o rompimento da membrana ou cápsula, especialmente quando a amostra é pressionada entre a lâmina e a lamínula;

- b) A estrutura pode ser observada ao exame microscópico direto a fresco, apresentando coloração marrom discreta, mesmo sem tratamento com corantes (Figura 1).
- c) Quando corada pelo Lugol, a estrutura se apresenta em tons amarelados/alaranjados (Figura 2).
- d) A estrutura cora em vermelho com Sudan III (Figura 3).
- e) Sob microscopia com filtro de luz polarizada a estrutura forma cruces de Malta (Figuras 4 e 5).

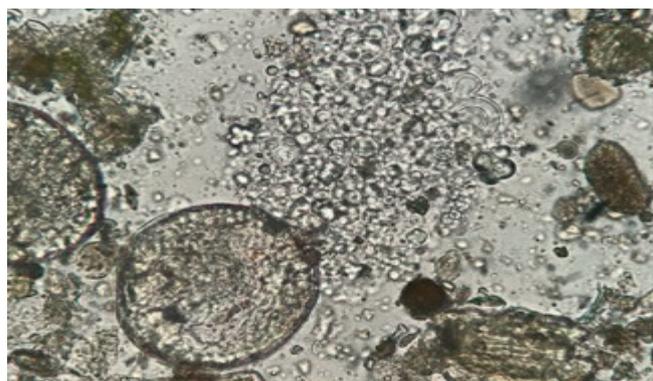


Figura 1. Estrutura com membrana rompida e conteúdo extravasando de seu interior. Exame direto a fresco de amostra de fezes. Microscopia de campo claro. Aumento original 400x.

Fonte: Cortesia do Prof. José Antonio Tesser Poloni.

¹ Farmacêutico-Bioquímico, Doutor em Ciências da Saúde, Professor da Escola de Saúde da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

² Farmacêutico-Bioquímico, Doutor em Ciências da Saúde, Professor de Microbiologia da Fundação Universidade Regional de Blumenau/FURB.

³ Farmacêutica-Bioquímica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC.

⁴ Farmacêutica-Bioquímica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora de Parasitologia Clínica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná/PUC-PR, Professora de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR.

⁵ Doutor em Ciências, Professor de Micologia Clínica e Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ.

⁶ Farmacêutica-Bioquímica, Doutora em Ciências Biológicas/Bioquímica, Professora de Parasitologia Clínica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.

⁷ Farmacêutica-Bioquímica, Mestre em Farmácia (área de concentração Análises Clínicas), Professora de Parasitologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC.

Instituição: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

DOI: 10.21877/2448-3877.202100021



Figura 2. Estrutura com membrana rompida e conteúdo extravasando de seu interior. Exame direto de amostra de fezes. Coloração pelo Lugol. Microscopia de campo claro. Aumento original 400x.

Fonte: Cortesia do Prof. José Antonio Tesser Poloni.

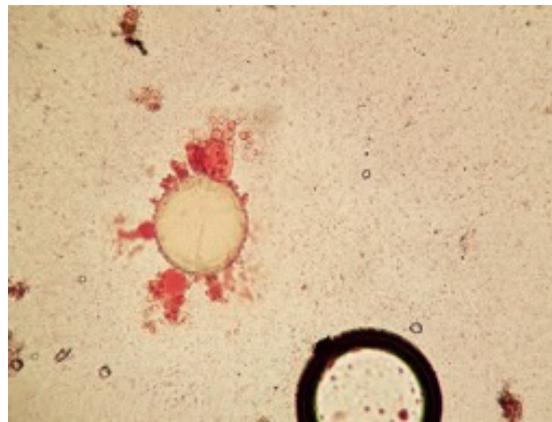
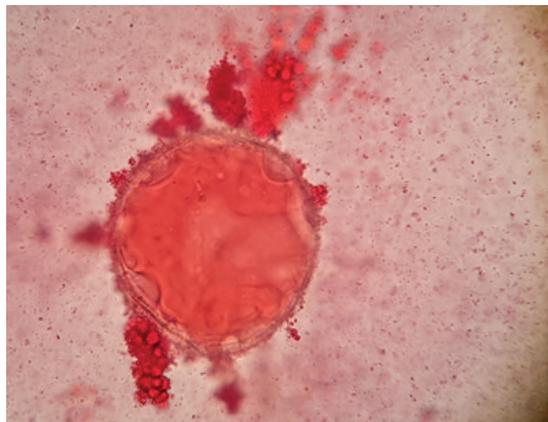


Figura 3. Estrutura com membrana rompida e conteúdo extravasando de seu interior. Exame direto de amostra de fezes. Coloração pelo Sudan III. Microscopia de campo claro. Aumento de 400x com zoom (esquerda) e aumento original de 400x (direita).

Fonte: Cortesia da Profa. Lenilza Mattos Lima.

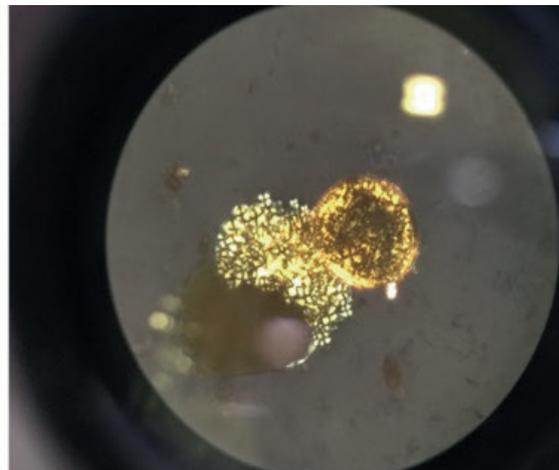


Figura 4. Estrutura com membrana rompida e conteúdo extravasando de seu interior. Exame direto de amostra de fezes. Coloração: Lugol. Microscopia de campo claro (esquerda) e microscopia com filtro de luz polarizada (direita). Aumento original 400x.

Fonte: Cortesia do Prof. José Antonio Tesser Poloni.

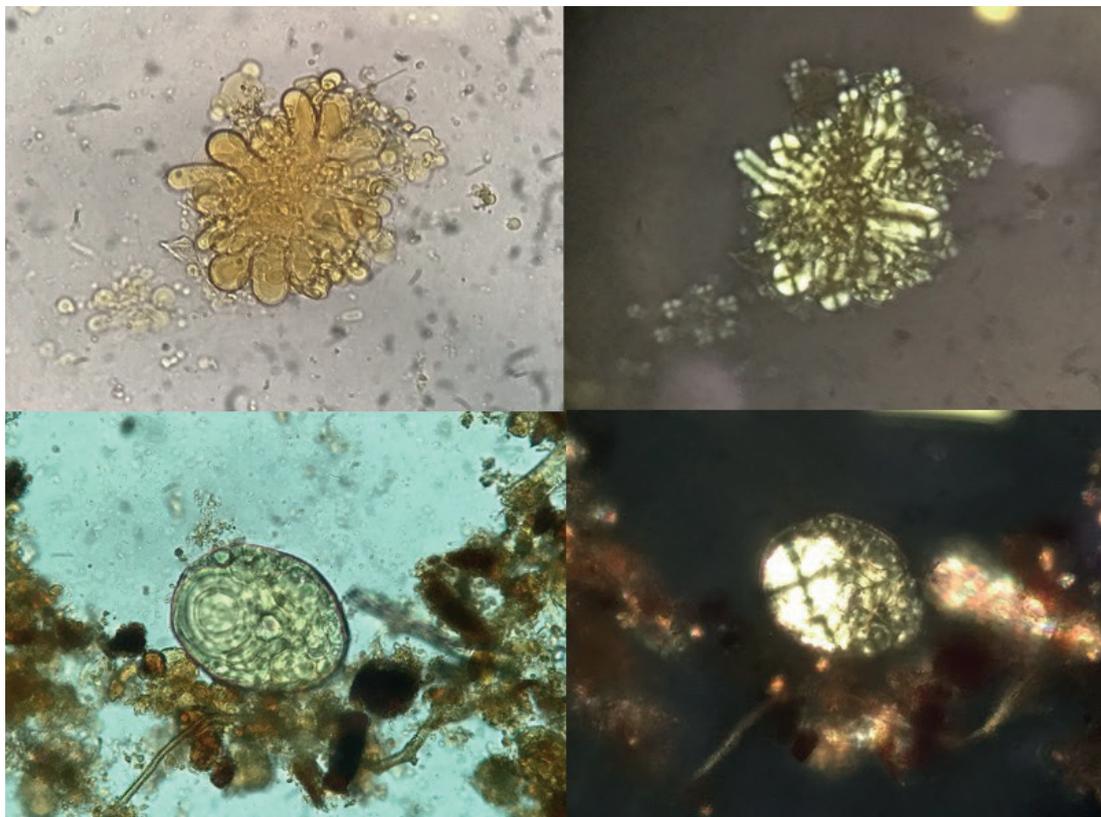


Figura 5. Estrutura com conteúdo "livre" (acima) e intacta (abaixo). Exame direto de amostra de fezes. Coloração: Lugol. Microscopia de campo claro (esquerda) e microscopia de luz polarizada (direita). Aumento original 400x.

Fonte: Cortesia do Prof. José Antonio Tesser Poloni.

EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS

A literatura disponível sobre o tema é escassa. Em uma das principais bases de dados na área da saúde, PubMed, a pesquisa pelo descritor *Urbanorum* spp. resulta em apenas dois artigos, sendo um do Brasil.^(2,3)

A Divisão de Doenças Parasitárias e Malária do Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) mantém uma plataforma digital contendo informações sobre praticamente todos os parasitos que podem causar infecções nos seres humanos (<https://www.cdc.gov/dpdx/index.html>). Neste endereço eletrônico não há qualquer informação sobre *Urbanorum* spp.

Até o presente momento não há relatos publicitados que comprovem que a estrutura se trata de um microrganismo, uma vez que:

- Não há relato de cultivo *in vitro*, o qual poderia evidenciar divisão celular;
- Não há estudo demonstrando a ultraestrutura celular e/ou organelas citoplasmáticas por microscopia eletrônica;
- Não há dados sobre análise molecular da estrutura, evidenciando material genético;

- Não há relatos de estudos filogenéticos e/ou taxonômicos da estrutura.⁽⁶⁾

A análise realizada por esta Comissão sugere que a estrutura é, muito provavelmente, um **artefato de conteúdo lipídico** (gordura). Tal conclusão baseia-se nas seguintes evidências:

a. Coloração vermelha após tratamento com Sudan III

O corante Sudan III ou Sudan Red G é um corante azóico lisocrômico, ou seja, com afinidade por lipídios. Com base nesta característica lipofílica, é utilizado para demonstrar presença de gorduras (lipídeos e lipoproteínas) em amostras biológicas. As gotas de gorduras, quando presentes, se apresentam coradas de vermelho em microscopia de campo claro.^(7,8)

b. Presença de cruz de Malta em microscopia de luz polarizada

Em análises clínicas, a microscopia de luz polarizada é utilizada para auxiliar na identificação de substâncias birrefringentes, como cristais e gotículas de gordura. Lipídios formados por ésteres de colesterol formam uma

estrutura em “cruz de Malta” com lados simétricos quando vistos sob luz polarizada.⁽⁹⁾

Estruturas anisotrópicas, como as gorduras, possuem birrefringência e são observadas em microscopia com luz polarizada com coloração amarelada brilhante. Estruturas isotrópicas são substâncias que possuem as mesmas propriedades físicas independentemente da direção considerada (p.ex. células) e não apresentam birrefringência, portanto, não são visualizadas em microscopia com luz polarizada.⁽¹⁰⁾

c. Ausência de organelas citoplasmáticas

Nas estruturas observadas não foram evidenciados núcleos e/ou qualquer organelas especializadas, características de células eucariotas unicelulares.

Relatos de caso sobre o *Urbanorum* spp. destacaram que os pacientes cujas amostras apresentavam estas estruturas também apresentavam sintomatologia intestinal, com resolução do quadro após tratamento farmacológico com antiparasitários.^(3,4,11,12)

Em relação a este argumento, ressaltamos que sintomas intestinais podem estar relacionados a uma série de outras condições patológicas, além das parasitoses, como: síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, intolerância alimentar, disbiose, deficiência pancreática exócrina, diarreia funcional, câncer de cólon, colite, doença da tireoide, doença celíaca, fibrose cística, entre outros. Muitas destas patologias cursam com a presença de gordura nas fezes. Ainda, sintomas intestinais decorrentes de intoxicação ou infecção alimentar, causa inflamatória, emocional ou medicamentosa, podem ser transitórios, o que justificaria sua resolução após tratamento com antiparasitário.^(13–17)

RECOMENDAÇÕES DA SBAC

Com base nas informações disponíveis até o momento, não há evidências científicas robustas que respaldem a identificação desta estrutura como sendo um microrganismo associado a doença infecciosa parasitária.

A SBAC recomenda, portanto, que **esta estrutura não seja reportada nos laudos de exames parasitológicos de fezes** para evitar tratamentos desnecessários e/ou inadequados para os pacientes.

OBSERVAÇÃO FINAL

Se, em algum momento, algum profissional conseguir demonstrar que se trata de um microrganismo e que seja patogênico aos seres humanos, este documento será revisado.

REFERÊNCIAS

1. Santamaría FT. *Urbanorum* spp. Buenas Tareas [Internet]. 2015; Available from: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Urbanorum-Spp/70918639.html>
2. Villafuerte RIM, Collado LAZ, Velarde CN. *Urbanorum* spp. in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016;33(3):593–5.
3. de Aguiar RPS, Alves LL. *Urbanorum* spp: First report in Brazil. *Am J Case Rep*. 2018;19:486–90.
4. Kruger EMM. *Urbanorum* spp.: novo parasita no Brasil. *Rev Bras Med Família e Comunidade*. 2020;15(42):2157.
5. Arriaga-Deza EV, Iglesias-Osores SA. *Urbanorum* spp. en Hospital Regional Lambayeque. *Rev Exp en Med del Hosp Reg Lambayeque*. 2016;2:156–57.
6. Silva-Díaz H. *Urbanorum* spp.: Controversia De Su Condición Biológica Y Aceptación Como Nuevo Parásito Intestinal. *RevExpMed*. 2017;3:3–4.
7. Mohamed SS, Mahmoud SM, Elgawish RA, Elhady KA. Sudan III Azo Dye : Oxidative Stress with Possible Geno and Hepatotoxic Effects in Male Rats. *Int J Sci Res*. 2016;5(10):1700–4.
8. Drummey GD, Benson JA, Jones CM. Microscopical Examination of the Stool for Steatorrhea. *N Engl J Med*. 1961;264(2):85–7.
9. Andriolo A, Bichara CDA, Garlipp CR, Poloni JAT, Fonseca KMN de L, Xavier LGM, et al. Microscopia. In: *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML): Realização de exames em urina*. 2017. p. 306.
10. Narine SS, Marangoni AG. Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: A review. *Food Res Int*. 1999;32(4):227–48.
11. Lopez JCB, Nunes LDS. *Urbanorum* spp: Segundo relato de caso no Brasil. *An do 10o Salão Int Ensino, Pesqui e Extensão*. 2019;10(1).
12. Casarin JN, Duarte SM da S, Sampaio JS. First reports from *Urbanorum* spp, meeting in sus patient flocs in a Private Imperatriz laboratory during 2018. *Int J Dev Res*. 2019;9(10):30676–8.
13. Bray GA, Ryan DH. Drug Treatment of the Overweight Patient. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2239–52.
14. Kurin M, Cooper G. Irritable bowel syndrome with diarrhea: Treatment is a work in progress. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(8):501–11.
15. Alkaade S, Vareedayah AA. A primer on exocrine pancreatic insufficiency, fat malabsorption, and fatty acid abnormalities. *Am J Manag Care*. 2017;23(12 Suppl):S203–S209.
16. Nikaki K, Gupte GL. Assessment of intestinal malabsorption. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016;30(2):225–35.
17. Pushpanathan P, Mathew G, Selvarajan S, Seshadri K, Srikanth P. Gut microbiota and its mysteries. *Indian J Med Microbiol*. 2019;37:268–77.

Prezado Editor,

Gostaria de informar que o artigo intitulado “PRE-VALÊNCIA SOROLÓGICA DO VÍRUS DA HEPATITE C NA REGIÃO CARBONÍFERA DO RIO GRANDE DO SUL” publicado na RBAC. 2021; 53(1): 45-49, além da autora

relacionada no referido artigo, contribuíram com a produção do trabalho e, por isso, são coautores: Jonas Michel Wolf e Allyne Cristina Grandó. Dessa forma, a autoria correta do artigo deve conter os seguintes nomes:

Cleomara Vieira Almeida, Jonas Michel Wolf e Allyne Cristina Grandó.

Correspondência

Cleomara Vieira Almeida
Av. Farroupilha, 8001 - São José
92425-020 – Canoas - RS, Brasil
E-mail: cleomarlmd@gmail.com



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 Trial Number [SRCTN], Netherlands 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 categorias 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: trabalhos 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”, “.tif” ou “.png” 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
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title <i>Incluir versão em Português</i>
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title <i>Incluir versão em Português</i>
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Abstract <i>Incluir versão em Português</i>
Palavras-Chave <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords <i>Incluir versão em Português</i>
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	Acknowledgements
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”.

SUORTE 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”, “.tif” ou “.png” 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-Excel em formato “.doc”, “.docx” ou “.xls” e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, 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 enviadas 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 apóstrofes 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/duos autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyajiri⁽²⁶⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea wernneckii*, 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,⁽⁶⁾ 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 com 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, Córdoba 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 Pentead 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 União 13 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, Brígido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em 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 **GNPapers**, no endereço: www.gnpapers.com.br/rbac/. 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 GNPapers, 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 GNPapers 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: ____/____/____.

MRC-PNCQ

Material de Referência Certificado

- ✓ No Brasil, o PNCQ é pioneiro na produção de MRC em matriz de soro humano liofilizado no segmento de análises clínicas.
- ✓ Caracterizado por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS).
- ✓ Os MRC podem ser utilizados para calibração de equipamentos, atribuição de valores a outros materiais, validação e verificação de desempenho dos sistemas analíticos e controle de qualidade.
- ✓ Parâmetros de bioquímica disponíveis: cálcio, creatinina, ácido úrico, glicose, sódio, potássio e magnésio.



O PNCQ é acreditado pelo Cgcre do INMETRO como Provedor de Ensaio de Proficiência em conformidade com a ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 sob o número 0013



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



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



Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

(21) 3172-7100 | 2569-6867

pncq@pncq.org.br

Rua Vicente Licínio, 193
Tijuca - Rio de Janeiro/RJ
CEP: 20270-340

[@PNCQoficial](https://www.facebook.com/PNCQoficial)

[@pncqoficial](https://www.instagram.com/pncqoficial)

[/pncq-oficial](https://www.linkedin.com/company/pncq-oficial)



www.pncq.org.br