

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Uso da filtragem de líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico  
microbiológico da Peritonite Bacteriana Espontânea em portadores de cirrose  
hepática

Lucas Chaves

Ribeirão Preto  
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Uso da filtragem de Líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico microbiológico da Peritonite Bacteriana Espontânea em portadores de cirrose hepática

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Departamento de Saúde Pública

Orientado: Lucas Chaves  
Orientador: Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública em 27/09/2019.

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Chaves, Lucas

Uso da filtragem de líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico microbiológico da Peritonite Bacteriana Espontânea em portadores de cirrose hepática. Ribeirão Preto, 2019. 57p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP Departamento de Saúde Pública

Orientador: Bellissimo – Rodrigues, Fernando

1. Cirrose hepática 2. Peritonite Bacteriana Espontânea 3. Diagnóstico Microbiológico 4. Filtragem do líquido ascítico

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lucas Chaves

Título do trabalho: Uso da filtragem de líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico microbiológico da Peritonite Bacteriana Espontânea em portadores de cirrose hepática

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Departamento de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Aparecida Géssia Bianchi Chaves e Adelino Alves Chaves Júnior, alicerces iniciais de minha jornada terrena, sem o amor e carinho de vocês não estaria aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer, para mim, é sobretudo reconhecer que em nenhum momento do trilhar em direção a algum objetivo foi feito só. Então faço os meus agradecimentos:

A Deus, pela sua infinita sabedoria ter me propiciado ao longo de todo esse percurso saúde, força e perseverança para prosseguir;

A meus pais, Aparecida Géssia Bianchi Chaves e Adelino Alves Chaves Júnior por amorosamente e pacientemente ouvirem diversas vezes sobre o meu trabalho e que procuraram incentivar o desenvolvimento dele e pelas significativas lições de burilamento do meu ser;

A meus irmãos Marcos, Marcelo e Adriana pelo apoio familiar e aos estímulos constantes a minha melhoria pessoal e profissional.

A meu cunhado Gustavo Yansen, a minhas cunhadas Cecília Rodrigues Teixeira e Renata Bastos por virem a somar em minha família e particularmente em minha vida; as minhas sobrinhas: Isabel Teixeira Chaves, Letícia Teixeira Chaves, Paola Chaves Yansen e Rafaela Chaves Yansen, ainda crianças, mas que sempre trazem luz e amor a minha pessoa;

A minha vó, Ermelinda Chaves (*In memoriam*) e Olga Magossi Bianchi (*In memoriam*) e ao meu avô, Adelino Alves Chaves (*In memoriam*), que independente em que esfera se encontram sou eternamente grato por tudo e em especial, é que através de vocês estou aqui hoje. E ao meu avô, Henrique Bianchi deixo expresso aqui também meu agradecimento;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues, pelos sábios ensinamentos acadêmicos e pessoais que sempre me lapidaram ao longo de todo esse trabalho;

Aos pacientes que consentiram participar do estudo sem os quais o estudo não teria sido realizado e que muito me ajudaram em minha evolução pessoal;

Indistintamente a todos os médicos residentes pelas correlações clínico-laboratoriais ensinadas, pela amizade, paciência e fundamentalmente pela realização da coleta do material para a presente pesquisa;

A toda equipe de enfermagem da paracentese pelo acolhimento desde o primeiro dia de coleta e pelos conselhos para a vida;

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez por sua cordialidade e por permitir o uso da infraestrutura laboratorial da seção de Microbiologia - Sorologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP);

A Profa. Dra. Fernanda Fernandes de Souza pela colaboração desde o exame de qualificação e até a inclusão dos últimos pacientes ao estudo.

A Biologista encarregada Renata Helena Candido Pocente, que além de sua amizade, possibilitou a troca de materiais quando se fez necessários;

Aos oficiais administrativos da Microbiologia Djanira e Flaviana e o Informata Redner, pelo acolhimento amigo;

A todos os pós-graduandos que eu tive a alegria da convivência nas disciplinas, simpósios, congressos e encontros fora do ambiente acadêmico.

Aos amigos de vida Erika Nascimento Castro Dias, Jênifer de Alcântara Lopes Viola, Patrícia Helena Grizante Barião, Patrícia Leão e Tiago Alexandre Cocio pelos aprendizados coletivos e quaisquer demonstrações de empatia durante todo o caminhar;

Ao funcionário do laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP-USP e amigo Carlos Roberto Cambrea, que ensinou a arte da microscopia na elucidação diagnóstica da Peritonite Bacteriana Espontânea. Aos demais funcionários do mesmo laboratório pela amizade e pela paciência nos telefonemas perguntando a respeito das citologias;

Aos aprimorandos e a toda equipe técnica do laboratório de Microbiologia da Unidade Campus e Emergência que processaram o material que foi encaminhado a rotina.

Aos amigos do curso de inverno que tive a feliz oportunidade de conhecer, de compartilhar agradáveis dias de convivência e dar o meu melhor como pós-graduando.

Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.

(Arthur Schopenhauer)

**Chaves, L.** Uso da filtração de líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico microbiológico da Peritonite Bacteriana Espontânea em portadores de cirrose hepática. 2019. 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

## RESUMO

A Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE) é atualmente a complicação infecciosa mais frequente em indivíduos com cirrose hepática e ascite. A PBE é comumente subdiagnosticada dada a manifestação clínica habitualmente inespecífica com que ela se apresenta. Em face disso, a análise citológica do líquido ascítico a partir da paracentese diagnóstica constitui um recurso diagnóstico indispensável para confirmar a presença de PBE. Contagens superiores a 250 polimorfonucleares/mm<sup>3</sup> no líquido ascítico na presença ou não de culturas positivas estabelecem o diagnóstico. Em menos de 40% dos casos a cultura do líquido ascítico é positiva, acarretando uma terapia empírica que resultam comumente em subtratamento ou supertratamento, induzindo inapropriadamente a resistência bacteriana. Assim, o presente trabalho procurou através de um estudo experimental laboratorial padronizar e, verificar a viabilidade técnica da filtração a vácuo do líquido ascítico como forma de otimizar o diagnóstico microbiológico da PBE. A padronização da técnica inicialmente pode ser verificada em ensaios pilotos e a viabilidade da técnica foi confirmada por meio do processamento do líquido ascítico daqueles pacientes que apresentaram confirmação citológica para PBE. Foram incluídos 36 pacientes com cirrose hepática, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) no período de novembro de 2017 a junho de 2019. Dentre eles, 17 (47,2%) apresentaram citologia compatível com PBE e, nesses últimos, a cultura pelo método semi-automatizado foi positiva em 6 casos (35,3%) e pelo método de filtração a vácuo do líquido ascítico em 2 casos (11,8%). Conclui-se que a filtração à vácuo não eleva a sensibilidade do diagnóstico microbiológico da PBE em relação ao método padrão. Por esse motivo é necessário o desenvolvimento de novas técnicas que aprimorem esse diagnóstico, de modo a nortear a terapia antimicrobiana nos pacientes acometidos por essa grave infecção.

**Palavras-chave:** Cirrose hepática, Peritonite Bacteriana Espontânea, Diagnóstico Microbiológico, Filtração do líquido ascítico.

**Chaves, L.** Use of ascitic fluid filtration as way to improve the microbiologic diagnosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis in patients with cirrhosis. 2019. 57f. Dissertation (Master). Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

### ABSTRACT

Nowadays, Spontaneous Bacterial Peritonitis (SBP) is the most common infection in individuals with liver cirrhosis and ascites. SBP is commonly underdiagnosed, usually given the nonspecific clinical manifestation. On the face of it cytological analysis from diagnostic paracentesis constitutes an indispensable diagnostic resource to confirm the presence of SBP or discard it. Counts greater than 250 polymorphonuclear cells / mm<sup>3</sup> in ascites fluid in the presence or absence of positive cultures establish the diagnosis. In less than 40% of cases ascitic fluid culture is positive, leading to empirical antibiotic therapy commonly resulting in undertreatment or overtreatment, inappropriately inducing bacterial resistance. So, the present study through experimental laboratory analysis tried to standardize and verify the technical feasibility of vacuum filtration of ascitic liquid as a way to improve the microbiological diagnosis of SBP. The standardization of the technique could initially be verified in pilot trials and the feasibility of the technique was confirmed by ascitic fluid processing of those patients who presented cytological confirmation for SBP. This study included 36 patients with liver cirrhosis who were consulted at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, from November 2017 to June 2019. Among them, 17 (47.2%) presented cytology compatible with SBP and, in the latter, culture by the semi-automated method was positive in 6 cases (35.3%) and by the vacuum filtration method of ascitic fluid in 2 cases (11.8%). In conclusion, vacuum filtration does not increase the sensitivity of SBP microbiological diagnosis in relation to the standard method. For this reason, it is necessary to develop new techniques to diagnostic improvement in order to guide antimicrobial therapy in patients affected by this severe bacterial infection.

**Keywords:** cirrhosis, Spontaneous Bacterial Peritonitis, Microbiological Diagnosis, Ascitic fluid vacuum filtration.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da circulação portal normal	3
<b>Figura 2</b>	Preparação do inóculo bacteriano	18
<b>Figura 3</b>	Experimento da posição da membrana	19
<b>Figura 4</b>	Técnica de <i>imprinting</i>	19
<b>Figura 5</b>	Membrana com a face lisa e quadriculada para cima	20
<b>Figura 6</b>	Uso de anticoagulantes	21
<b>Figura 7</b>	Uso do EDTA no líquido ascítico	22
<b>Figura 8</b>	Uso de Heparina sódica no líquido ascítico	22
<b>Figura 9</b>	Filtragem do líquido ascítico sem anticoagulante	23
<b>Figura 10</b>	Sistema de filtragem e seus componentes	24
<b>Figura 11</b>	Membrana filtrante	24
<b>Figura 12</b>	Trajeto das amostras nos diferentes laboratórios	26
<b>Figura 13</b>	Procedimentos realizados nos laboratórios	27
<b>Figura 14</b>	Esquema de identificação do agente isolado e do seu respectivo teste de sensibilidade aos antimicrobianos	29
<b>Figura 15</b>	Distribuição relativa da etiologia envolvida na cirrose dos pacientes incluídos no estudo (n = 36)	35
<b>Figura 16</b>	Complicações da cirrose hepática por número de pacientes incluídos no estudo (n = 36)	36
<b>Figura 17</b>	Distribuição dos pacientes incluídos pelo score de Child-Pugh (n=36)	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALC – álcool

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATHOS – Atenção Hospitalar

CBP - Colangite Biliar Primária

CHC - Carcinoma hepatocelular

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EH - Encefalopatia hepática

EHNA - Esteato-hepatite não alcoólica

h - horas

HAI - Hepatite autoimune

HCFMRP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HDA - Hemorragia digestiva alta

HM - Hepatite medicamentosa

HP - Hipertensão Portal

µm - micrômetro

M - Molar

min - minuto

ml - mililitro

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBE - Peritonite Bacteriana Espontânea

% - porcentagem

PMN - Polimorfonucleares

REDCap® Research Electronic Data Capture

SHR - Síndrome hepatorenal

spp. - Espécies

U - Unidades

UFC - Unidade formadora de colônia

VHB - Vírus da Hepatite B

VHC - Vírus da Hepatite C

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Dados clínicos e demográficos dos pacientes cirróticos incluídos no estudo.	33
<b>Tabela 2</b>	Resultado dos glóbulos brancos, porcentagem de PMN, valor absoluto de PMN, glóbulos vermelhos expressos em mm <sup>3</sup> e PMN corrigido dos líquidos ascíticos incluídos no estudo	38
<b>Tabela 3</b>	Registro dos pacientes no REDCap®, volume inoculado no sistema semi-automatizado em mililitros, resultado da citologia, microrganismo isolado pelo método semi-automatizado, volume filtrado em mililitros e microrganismo pelo método da filtração	41
<b>Tabela 4</b>	Avaliação da sensibilidade e especificidade das culturas semi-automatizada e após filtração do líquido ascítico em relação ao padrão-ouro (citologia) do diagnóstico de PBE.	43

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
SUMÁRIO.....	vii
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Doenças hepáticas e cirrose hepática .....	1
1.2 - Fisiologia da circulação portal normal, hipertensão portal e ascite.....	2
1.3 - Peritonite bacteriana espontânea (PBE) .....	4
1.4 – Diagnóstico laboratorial da PBE – Citologia e cultura .....	5
1.5 - Diagnóstico Etiológico da PBE.....	6
1.6. - Agentes etiológicos.....	7
1.7 - Tratamento e resistência bacteriana .....	9
2 - JUSTIFICATIVA .....	13
2.1 - OBJETIVOS .....	13
2.1.1 – OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 - PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1 - Pacientes.....	15
3.1.2 - População de referência e de estudo.....	15
3.2 - Critérios de inclusão .....	16
3.2.1 - Critérios de exclusão .....	16
3.3 - Delineamento do estudo .....	16
3.3.1 - Tamanho amostral.....	16
3.3.2 - Modelo de estudo .....	16
3.3.3 - Local de estudo .....	16
3.4 - Usos dos sistemas do HCFMRP-USP .....	16
3.5- Uso do RedCap ® (Research Electronic Data Capture).....	17
3.6 - Racional teórico.....	17
3.7 - Esterilização dos materiais .....	17
3.8 -Testes pilotos .....	18
3.8.1 - Porosidade da membrana.....	18
3.8.2 - Uso de anticoagulantes .....	20
3.9 - Padronização do processamento do líquido ascítico pelo sistema de filtração. ....	24
3.9.1 - Dos componentes do sistema de filtração .....	24
3.9.2 - Da bomba a vácuo e da membrana.....	25
3.10 - Inclusão dos pacientes ao estudo.....	26
3.11 - Obtenção da amostra para contagem celular, para a análise microbiológica e para a pesquisa .....	26
3.12 - Da filtração propriamente dita, da incubação da amostra e do descarte dos resíduos gerados.....	28
3.13 - Identificação do isolado clínico do método da filtração .....	29
3.14 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos e sua interpretação.....	29

3.15 - Aspectos éticos.....	30
4 – RESULTADOS .....	32
4.1.1 - Etiologia da Cirrose .....	35
4.1.2 - Complicações da Cirrose .....	35
4.1.3 SCORE de CHILD PUGH .....	36
4.2 - VARIÁVEIS CITOLÓGICAS.....	37
4.3 - VARIÁVEIS MICROBIOLÓGICAS .....	40
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO .....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
8. APÊNDICE .....	56
8.1. Aprovação do comite de ética .....	56
8.2. Parecer – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - Unidade de Emergência.....	57

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Doenças hepáticas e cirrose hepática

As doenças hepáticas são didaticamente agrupadas em duas categorias, sendo a primeira, denominada como hepatocelular, na qual inflamação e necrose são as características que representam a injúria celular. Já a segunda, designada como doenças colestáticas, é caracterizada pela interdição do fluxo biliar. Na primeira, temos como exemplos as hepatites virais e a doença alcoólica. Na outra, podemos elencar a colelitíase, a colangite biliar primária e outras em que há participação de medicamentos no processo de indução (SOUZA, 2010).

As hepatites virais constituem um sério problema de saúde pública no âmbito nacional e mundial. As hepatites infecciosas de interesse humano são causadas por cinco tipos de vírus. São eles: A, B, C, D e E.

Entre as cinco, as hepatites B e C, cujos agentes etiológicos são conhecidos pelas siglas HBV e HCV, respectivamente, têm ganhado destaque em face de sua elevada prevalência, morbidade e mortalidade, além de existir a possibilidade variada de cronificação.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mundialmente, 2 bilhões de pessoas já entraram em contato com o vírus da hepatite B (HBV), e, desses, 240 milhões possuem sua forma crônica. A forma aguda geralmente é assintomática ou oligossintomática, porém 5-10% dos infectados tornam-se portadores crônicos, e o restante evolui para a cura espontânea. (OTT et al., 2012)

Para a hepatite C, mundialmente, há uma estimativa de 71 milhões de pessoas portadoras e 400 mil óbitos por ano atribuídos a complicações da doença, sobretudo à cirrose hepática e ao hepatocarcinoma. (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014; WHO, 2018)

No Brasil, detectou-se 700 mil casos com sorologia anti-HCV positiva na população com faixa etária de 15-69 anos, em 2016 (BENZAKEN et al., 2018).

A hepatite C pode se apresentar tanto na forma aguda como na forma crônica. A hepatite C aguda na maioria dos casos é assintomática e de evolução subclínica, dificultando o diagnóstico apropriado, diferentemente da hepatite crônica pelo HCV, que tem como característica o processo inflamatório permanente. A cronificação pode acometer até 85% dos infectados, e geralmente 20% dos casos evoluem para cirrose hepática. (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

Outro fator que é decisivo na ocorrência das hepatopatias crônicas e evolução para a cirrose é o uso abusivo do álcool, constituindo o que é denominado por cirrose hepática alcoólica (MOYSÉS; MINCIS, 2006).

A esteato-hepatite não alcoólica (EHNA ou na sigla em inglês NASH) de forte associação com a síndrome metabólica é também outra doença associada à fibrose hepática.(MEDINA et al., 2004)

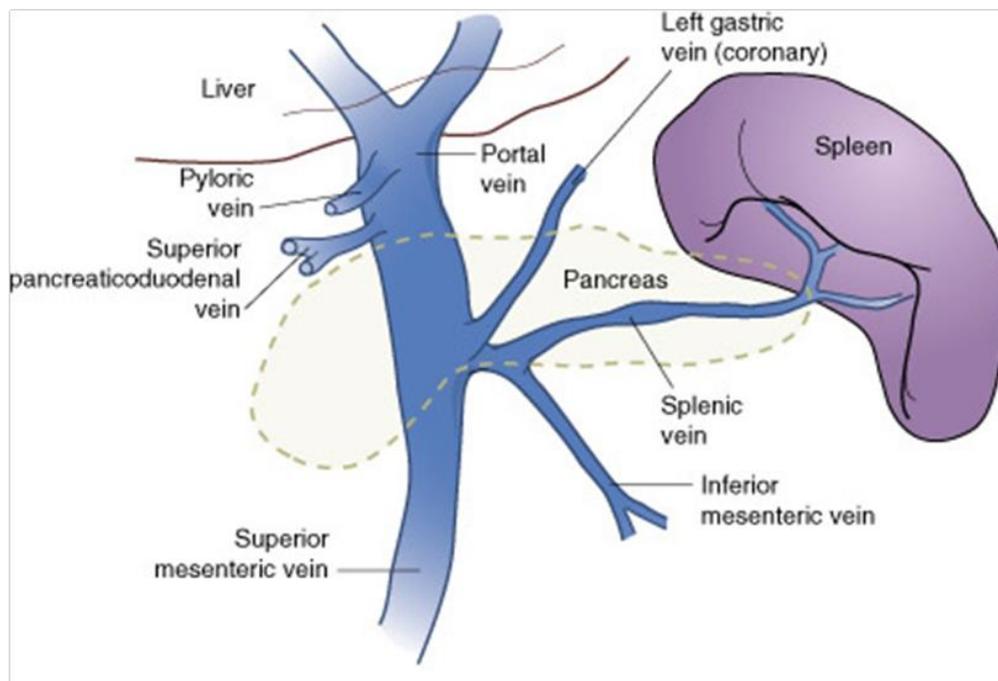
Os pacientes portadores dessas enfermidades podem evoluir para a cirrose e conseqüente insuficiência hepática. A cirrose é resultado de alterações na arquitetura do fígado, com prejuízo da vascularização e da síntese proteica, com conseqüente formação de fibrose, sendo o desfecho de súbitas destruições hepáticas ou agressão progressiva dos hepatócitos. (ARAÚJO; BARONE, 2010; BRASILEIRO FILHO, 2011, FERRAZ; SCHIAVON; SILVA 2014)

Indivíduos cirróticos estão propensos a inúmeras complicações, dentre elas a ascite, a hemorragia digestiva alta varicosa, a encefalopatia hepática e a peritonite bacteriana espontânea.

## **1.2 - Fisiologia da circulação portal normal, hipertensão portal e ascite.**

A veia porta é a junção da veia esplênica e mesentérica superior (Figura 1). Em indivíduos hígidos, a pressão portal normal conferida a esses vasos apresentam baixa resistência e alta complacência, possibilitando a chegada de grandes volumes sanguíneos no fígado. Já nos cirróticos, devido à presença de fibrose avançada e nódulos de regeneração, a pressão portal se inverte, evoluindo com alta resistência e baixa complacência, caracterizando a hipertensão portal. (GARCIA-TSAO et al., 2017)

**Figura 1** – Representação esquemática da circulação portal normal. Anatomia da circulação portal.



**Fonte:** Hansen e Koeppen (2003).

A partir da hipertensão portal há aumento do óxido nítrico endógeno, um importante vasodilatador, que contribui para a retenção em nível renal de sódio e consequente sobrecarga de volume intravascular e, por fim, formação da ascite. Uma vez formada a ascite, um ciclo vicioso é estabelecido, pois haverá aumento na atividade simpática e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando a uma maior retenção de sódio e, como consequência, maior sobrecarga de volume ao sistema intravascular e formação de mais ascite. (RUNYON,2014, p.1556)

A ascite é definida como o acúmulo de líquido livre na cavidade peritoneal, sendo a cirrose hepática a sua principal causa (75% dos casos). Outras etiologias que podem ser elencadas são: as neoplasias, a insuficiência cardíaca, a tuberculose peritoneal e a pancreatite aguda (MOORE; AITHAL; MOORE, 2006).

Estima-se que 60% dos cirróticos desenvolverão ascite em um período de até 10 anos de evolução, o que acarreta pior prognóstico. (POSE. E; CARDENAS. A.,2017). Nos pacientes cirróticos e com ascite torna-se mandatório realizar a paracentese diagnóstica em toda ascite de início recente ou diante da suspeita clínica de PBE.

### 1.3 - Peritonite bacteriana espontânea (PBE)

A patogênese das infecções bacterianas em pacientes cirróticos apresenta uma dinâmica complexa que envolve vários mecanismos: a predisposição genética, a disfunção da barreira intestinal e a alteração do sistema imune. A disfunção da barreira intestinal juntamente com o supercrescimento bacteriano pode culminar na translocação bacteriana, principal mecanismo aceito atualmente na patogênese da peritonite bacteriana espontânea (PBE). O supercrescimento bacteriano pode ser resultante de um baixo trânsito intestinal devido à diminuição do peristaltismo, da secreção reduzida de ácido gástrico e das deficiências imunológicas entéricas. (EKPANYAPONG; REDDY, 2019)

No que se refere à alteração do sistema imune, o paciente cirrótico apresenta graus variáveis de imunossupressão, dada a diminuição da atividade das células fagocitárias, aliada à baixa imunidade humoral e à baixa atividade de opsonização dos fagócitos. (LATA.J et al., 2009)

Nos pacientes cirróticos e com hipertensão portal, a microcirculação da mucosa intestinal é prejudicada pela perda de junções íntimas entre as células epiteliais, prejudicando a integridade da mucosa e facilitando as translocações bacterianas.

A translocação bacteriana é definida pela migração dos microrganismos ou das endotoxinas bacterianas do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos através da circulação sistêmica ou veia porta para a corrente sanguínea (ASCIONE et al., 2017)

Esses múltiplos mecanismos somados aos agravos da hipertensão portal são responsáveis por uma diversidade de manifestações clínicas que incluem: instabilidade hemodinâmica, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, encefalopatia hepática, síndrome hepatorenal e desenvolvimento de infecções graves e recorrentes. Na grande maioria dos casos essas infecções são bacterianas. (CARROLA; MILITÃO; PRESA, 2013)

A principal infecção bacteriana encontrada nesses pacientes é a PBE (MATTOS, 2003).

A proporção de pacientes que evoluem para óbito observada após o primeiro episódio de PBE em um mês, seis meses e em doze meses é, respectivamente: 33%; 50% e 58% (KHAN J et al., 2009)

A PBE em cirróticos é frequentemente subdiagnosticada, devido ao fato de suas manifestações serem insidiosas e da diversidade clínica de sintomas que o paciente pode apresentar. Apenas 1/3 dos pacientes apresentam os sinais e sintomas típicos da peritonite, como febre, dor abdominal, constipação e diarreia. Nos demais, a doença pode se manifestar por ascite refratária, choque e encefalopatia hepática, sendo esses considerados fatores de descompensação do quadro clínico geral. (RUNNYON BA, 1998)

Sendo assim, para que a análise do líquido ascítico possa ser realizada e, através dela, diagnósticos sejam confirmados, é necessário a realização da paracentese diagnóstica, um procedimento relativamente simples e de baixo risco. Para realizá-lo com segurança, um médico treinado deve empregar técnica asséptica, evitando assim a contaminação secundária da cavidade abdominal.

#### **1.4 – Diagnóstico laboratorial da PBE – Citologia e cultura**

A análise do líquido ascítico, no que se refere à sua celularidade, é um recurso imprescindível para confirmar ou descartar a presença de PBE, e fazer a confirmação diagnóstica. (RUNNYON BA, 1998).

Uma vez obtido o líquido ascítico através de uma paracentese diagnóstica, esse é destinado a análises celulares, bioquímicas e microbiológicas. Diante de uma infecção peritoneal há uma reação inflamatória local, repercutindo em um aumento do número de neutrófilos no líquido ascítico.

Portanto, a contagem citológica constitui um recurso indispensável para a confirmação diagnóstica de PBE, quando as contagens de polimorfonucleares são habitualmente iguais ou superiores a 250 células/mm<sup>3</sup>, sendo este considerado um ponto de corte sensível, e que possui aplicabilidade universal. (WIEST et al., 2012).

Quanto à caracterização etiológica, faz-se necessário preferencialmente a inoculação beira leito do líquido ascítico em frasco de hemocultura, com volume idealmente de 10 ml, e antes do início de qualquer terapia antimicrobiana, visando obter a máxima sensibilidade desse método (CARROLA; MILITÃO; PRESA, 2013)

O líquido ascítico uma vez no laboratório, é incubado a 37°C sob agitação constante em aparelhos semi-automatizados, os quais são monitorados de maneira contínua e, sendo o resultado positivo, o isolamento bacteriano é realizado em meios apropriados, seguido da identificação bacteriana e seu respectivo teste de

sensibilidade aos antimicrobianos. (ANVISA., 2013)

Os patógenos bacterianos mais comumente isolados no líquido ascítico de pacientes com PBE são membros pertencentes à família das Enterobactérias (CHEONG et al., 2009).

### 1.5 - Diagnóstico Etiológico da PBE

Muito embora os agentes mais frequentes causadores de PBE sejam conhecidos, o diagnóstico etiológico através da realização de exames microbiológicos tem apresentado grandes dificuldades para sua identificação definitiva.

No hospital de Korle-Bu em Gana, os diagnósticos microbiológicos foram realizados através da inoculação direta do líquido ascítico em frascos de hemocultura. Seus resultados apresentavam positividade de 26,67% quando semeados no meio ágar-sangue e ágar Mac Conkey.(DUAH; NKRUMAH, 2019). Já em um hospital Nigeriano, utilizando o mesmo método diagnóstico, a cultura foi positiva em 66,7% dos episódios. (OLADIMEJI et al., 2013). Num outro estudo realizado na China, a cultura de líquido ascítico seguiu as normas recomendadas pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para processamento de amostras biológicas e a positividade encontrada foi de 44,7% (DING et al., 2019).

Em um hospital terciário alemão, referência no cuidado de doenças do fígado, os diagnósticos etiológicos foram feitos por meio da semeadura do líquido ascítico proveniente de frascos de hemocultura à beira do leito. Uma vez positivos, o líquido era semeado no ágar columbia 5% de sangue de carneiro, ágar chocolate, ágar Mac Conkey, ágar Schaedler e ágar kanamicina–vancomicina e a inoculação de caldo tioglicolato. Ágar Columbia, Chocolate e Mac Conkey ficaram incubados por 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> de 24 a 48h. Os demais foram incubados por 37°C em uma câmara anaeróbia por 48h. A sensibilidade encontrada por esse grupo alemão foi de 36,6% (FRIEDRICH et al., 2016)

Um grupo de pesquisadores norte-americanos da região de Massachusetts, fazendo uso dos métodos de inoculação direta do líquido ascítico beira leito em frascos de hemocultura, encontrou valores positivos em 35% das citologias sugestivas de PBEs. (ARDOLINO; WANG; PATWARDHAN, 2019)

Já em grupo na Eslováquia, muito embora a incidência de PBE tenha sido

baixa na população estudada, a cultura foi positiva em 56% dos casos. (ADAMCOVÁ-SELCANOVÁ.S et al., 2016).

Em um trabalho no sudeste do Brasil no qual foram incluídos 45 pacientes com cirrose descompensada, 15 apresentaram citologia compatível com PBE, desses, apenas 20% das culturas foram positivas. (THIELE et al., 2014)

No nosso serviço, no qual são seguidas as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um trabalho prévio constatou uma positividade de apenas 13,5% nas culturas de líquido ascítico de pacientes com PBE (Dados locais, não publicados).

### 1.6. - Agentes etiológicos

Em um estudo retrospectivo realizado em um hospital Chinês, durante um período de cinco anos (2012 - 2016), foi possível obter 334 registros de culturas bacterianas de pacientes com PBE nosocomial ou comunitária. Dessas, 155 eram PBE - nosocomial, definida como aquela que ocorreu depois de 48h após a admissão hospitalar, e as restantes 179 eram PBE - comunitária, definida como aquela que ocorreu até às 48h de admissão hospitalar. Apenas um episódio foi incluído durante o período do estudo e as bactérias isoladas altamente sugestivas de contaminação não foram consideradas, visto que o paciente apresentou um único episódio pelo microrganismo em questão. Casos de peritonites secundárias foram excluídos dos estudos.

Nesse estudo, houve predomínio de bactérias Gram-negativas (53,3%/178 casos) tanto na PBE - nosocomial como na PBE - comunitária, sendo o principal microrganismo identificado, *Escherichia coli* (45,5%/81 casos). Das 138 bactérias que foram identificadas como Gram-positivas, o principal patógeno nosocomial foi *Enterococcus faecium* (20,3%/28 casos) e para as comunitárias houve predomínio de outros *Streptococcus* spp. (13%/18 casos) que não o *Streptococcus pneumoniae* (DING et al., 2019)

No principal centro de saúde de Gana, localizado na África Ocidental, em um período de oito meses (março a novembro de 2016) foi possível encontrar 30 citologias sugestivas de PBE, dos 140 pacientes adultos incluídos na pesquisa. A cultura destes 30 pacientes com citologia sugestiva de PBE veio positiva em apenas 8 casos (26,6%), sendo o principal agente Gram-negativo identificado, *Escherichia coli*, em 5 ocasiões; quanto aos Gram-positivos, foram isolados, sendo 1 episódio de

cada espécie que se sucede: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus viridans* (DUAH; NKRUMAH, 2019)

Em um trabalho de cinco anos de caráter retrospectivo realizado em um hospital público terciário brasileiro, foram avaliadas amostras de culturas de líquido ascítico. Das 691 amostras, 219 (31,7%) apresentavam citologia sugestiva de PBE e as demais 472 (68,3%) apresentavam citologia com menos de 250 neutrófilos/mm<sup>3</sup> no líquido ascítico. Dessas com citologia superior a 250 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, 63 (28,8%) culturas vieram positivas. O principal agente identificado dentre as culturas positivas foi *Escherichia coli*, em 20 ocasiões (31,7%), seguido de 5 casos de *Streptococcus pneumoniae* (7,9%). (REGINATO et al., 2011)

Em um levantamento durante três períodos distintos, perfazendo um total de 17 anos de observação de pacientes com PBE e com cultura positiva em um hospital de referência no sul do Brasil, foi possível notar uma transição do perfil dos agentes etiológicos isolados de culturas dos líquidos ascíticos. No período inicial, de 1997 a 1998, das 33 culturas, o principal patógeno isolado foi *Escherichia coli*, 13 (39,4%), seguido de *Staphylococcus* coagulase-negativos em 6 (18,2%) dos casos. No segundo período, que contemplaram os anos de 2002 a 2003, foram obtidos 43 casos, dos quais houve predominância dos *Staphylococcus* coagulase-negativos em 16 casos (37,2%), seguido de *Staphylococcus aureus* em 8 casos (18,6%) e *Klebsiella pneumoniae* em apenas 3 casos (6,98%). No terceiro e último período, de 2014 a 2015, houve 58 casos, porém, desses, 7 casos tiveram culturas polimicrobianas. As bactérias mais frequentes nos casos monocrobianos foram: *Escherichia coli* em 15 casos (29,4%), seguida de *Streptococcus viridans* em 12 (23,5%), *Klebsiella pneumoniae* em 10 casos (19,6%) e *Enterococcus faecium* 5 (9,8%) (ALMEIDA et al., 2018).

Em um estudo de caráter retrospectivo em que foi analisada a frequência dos agentes identificados no líquido ascítico e seus respectivos padrões de sensibilidade para pacientes cirróticos, no período de 2007 a 2013, foi possível observar que dos 311 pacientes cirróticos, 114 pacientes apresentaram culturas positivas e com citologias sugestivas de PBE (36,6%), enquanto 197 apresentaram ascite neutrofilica. De 138 culturas, 66 eram por patógenos Gram-positivos (47,8%), em ordem decrescente de frequência *Enterococcus* spp.; *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. 62 espécies eram Gram-negativas (44,9%), sendo a mais encontrada a *Enterobacter* spp., em 56 episódios (90,3%). (FRIEDRICH et al., 2016)

Na América do Sul, um estudo retrospectivo brasileiro que durou 5 anos (novembro de 2001 a novembro de 2006), pôde-se observar isolamento nas culturas positivas para PBE de *Streptococcus* spp. em 15 das 63 culturas e *Staphylococcus aureus* em 5 das 63, o que correspondeu, em percentual, respectivamente, a 23,8 e 7,9. Já na Argentina, em um estudo prospectivo de um ano (março de 2011 a abril de 2012), foi notório o predomínio de Gram-positivos em 21 dos 33 casos, o que correspondeu a 63,6% dos agentes isolados de cultura de pacientes com PBE. As principais espécies encontradas foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. O percentual de isolamento foi, respectivamente: 24,2%/8 casos; 24,2%/8 casos; 12,1%/4 casos e 3%/1 caso (FIORE et al., 2017).

Em um estudo de um grupo grego em que seguiu a inclusão dos pacientes em dois períodos, sendo o primeiro de 1998 a 1999 e o segundo de 2000 a 2002, pôde-se observar um número próximo de culturas positivas para ambos os períodos. No primeiro, o resultado foi de 20 culturas e, no segundo, de 22. Nos anos de 1998 a 1999, 70% das culturas eram positivas para microrganismos Gram negativos, com predomínio da *Escherichia coli*, já nos anos de 2000 a 2002, na qual 59% dos isolados eram Gram-positivos, sendo o principal agente *Enterococcus* spp. responsáveis por 46% dos casos (CHOLONGITAS et al., 2005).

Em nosso serviço nas unidades Campus e Emergência, no qual foram analisados registros do período de janeiro 2010 a dezembro 2015, apenas 61 culturas foram positivas das 450 com citologia para PBE, sendo *Escherichia coli* o principal agente encontrado, em 19 casos ou 31% das culturas. Espécies de *Enterococcus* foram responsáveis por 8 casos ou 13% das culturas, sendo 7 (11% dos casos) para os *Enterococcus faecalis* e 1 (2% dos casos) para *Enterococcus faecium* (Dados locais, não publicados).

Para o tratamento das PBE, o principal antibiótico utilizado é a ceftriaxona e, para a profilaxia secundária, norfloxacin.

## 1.7 - Tratamento e resistência bacteriana

No que se refere ao tratamento da PBE, antes mesmo que o antibiograma

esteja liberado, é premente o início da terapia antimicrobiana de amplo espectro direcionada aos principais patógenos. Eventualmente, o descalonamento da antibioticoterapia poderá ser realizado se o agente etiológico for rapidamente identificado e for sensível a antimicrobianos de menor espectro clínico.

As diretrizes mais antigas, que datam das décadas de 80 e 90, recomendaram, em face do diagnóstico de PBE, o uso de Cefalosporinas de terceira geração ou Fluorquinolonas. Porém, estudos mais atuais têm demonstrado um aumento de resistência para os microrganismos Gram-negativos, bem como, também, o crescente aumento no isolamento de bactérias Gram-positivas no líquido ascítico desses pacientes, o que tem impulsionado a utilização de antimicrobianos de mais largo espectro (CHOLONGITAS et al., 2005; FRIEDRICH et al., 2016).

Em um estudo realizado em um centro médico em Boston, Massachusetts, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2015, 56 casos de PBE foram diagnosticados com isolamento de 70 microrganismos, porém apenas 56 apresentavam a realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. De maneira geral, dos 44,64% isolados Gram-negativos, 68% eram sensíveis à ceftriaxona e 56% a ciprofloxacina. A principal bactéria Gram-negativa isolada foi *Escherichia coli*, com 17 casos, apresentando 71% dos isolados sensíveis a este antibiótico. Nesse mesmo trabalho houve isolamento de dois bacilos não-fermentadores da glicose, ambos *Pseudomonas aeruginosa*, e um fermentador da lactose, *Citrobacter* spp, sendo que os três apresentavam resistência a ceftriaxona, porém todos com sensibilidade a ciprofloxacina. Quanto aos Gram-positivos isolados, houve 7 *Enterococcus* spp., sendo que cinco deles eram resistentes à Vancomicina. Dos 5 *Staphylococcus* spp isolados, 2 eram *Staphylococcus aureus* e 3 eram coagulase-negativos (ARDOLINO; WANG; PATWARDHAN, 2019).

Em uma coorte realizado no período de março de 2012 a fevereiro de 2016 no hospital terciário alemão Bonn, referência no ensino, foi possível acompanhar 86 pacientes que apresentaram 92 episódios de PBE, sendo que 48 culturas foram positivas (52,1%). Os bacilos Gram-negativos, de modo geral, tanto nos episódios hospitalares como nos comunitários, apresentaram resistência, em percentual, às cefalosporinas de terceira geração, respectivamente, de 30 e 33; para as Quinolonas de 50 e 18; para os Carbapenêmicos de 13 e 0 (LUTZ et al., 2017).

Em um estudo chinês pôde-se observar que 334 (44,7%) dos pacientes

apresentavam cultura positiva naqueles que tinham PBE confirmadas pela citologia, 178 (53,3%) isolados correspondiam a bactérias Gram-negativas e, dessas, *Escherichia coli* foi o principal patógeno isolado e identificado, perfazendo 81 isolados (24,3%). Nas PBEs nosocomiais, ou seja, aquelas em que o episódio tenha ocorrido após 48h da internação hospitalar, a resistência encontrada para *Escherichia coli* frente à cefotaxima foi de 84,3%; já naquelas PBEs adquiridas na comunidade, sendo definidas como aquelas que se manifestam até 48h da internação hospitalar, a resistência foi de apenas 30,6%. A resistência encontrada para *Klebsiella pneumoniae* para esse mesmo antimicrobiano foi de 28,6% nos casos hospitalares e de 7,7% daquelas adquiridas na comunidade. Para os *Enterococcus* spp isolados de PBEs nosocomiais, a resistência a vancomicina encontrada foi de 18,6%, já para as PBEs comunitárias, 9,1% (DING et al., 2019).

Em nosso serviço, um hospital terciário, localizado na cidade de Ribeirão Preto, foram obtidos registros de pacientes com culturas positivas para PBE no período de 2010 a 2015 e a resistência a ceftriaxona para *Escherichia coli* encontrada foi de 17% e 11% para *Klebsiella pneumoniae* (Dados locais, não publicados).

É notório observar o crescimento alarmante da frequência de microrganismos multidrogaresistentes em pacientes cirróticos e que não ficam restritos a dados locais, acabando por comprometer de maneira direta a sua sobrevivência. Ademais, há uma tendência crescente no isolamento de patógenos Gram-positivos e, somado a isso, os métodos microbiológicos ainda são bastante falhos, apresentando uma baixa sensibilidade, sendo incapazes de identificar de maneira apropriada, na maioria das vezes, os agentes etiológicos das PBEs. Como consequência, a terapia antimicrobiana desses episódios é realizada de forma empírica, o que pode levar a um subtratamento, quando a droga escolhida não atua no patógeno em questão. Pode, ainda, ocorrer um supertratamento, quando a droga escolhida tem espectro excessivamente amplo para o patógeno em questão, impulsionando desnecessariamente o desenvolvimento da resistência bacteriana.

---

## **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## **2 - JUSTIFICATIVA**

Em virtude deste cenário de baixa positividade das culturas colhidas de pacientes com diagnóstico clínico e citológico de PBE, torna-se evidente a necessidade de se estudar novas formas de diagnóstico microbiológico que possam melhorar sua sensibilidade e especificidade, de forma a subsidiar um tratamento antimicrobiano adequado às necessidades do paciente, sendo essa a principal justificativa do estudo que ora se propõe.

### **2.1 - OBJETIVOS**

#### **2.1.1 – OBJETIVO GERAL**

Avaliar, padronizar e verificar a viabilidade do processo de filtração a vácuo do líquido ascítico para o diagnóstico etiológico das PBEs.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** - Caracterizar os pacientes com PBE segundo variáveis demográficas, citológicas e clínicas.

**2.2.2** - Identificar quais são os agentes bacterianos isolados no líquido ascítico em indivíduos com PBE.

**2.2.3** - Estudar o perfil de sensibilidade dos isolados frente aos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica

**2.2.4** - Estimar os valores de sensibilidade, especificidade da cultura do líquido ascítico após a filtração a vácuo, quando comparadas à técnica tradicional para o diagnóstico etiológico das PBE.

---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 - PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Pacientes**

Os pacientes cirróticos foram caracterizados segundo variáveis demográficas, clínicas, citológicas e microbiológicas.

No que diz respeito às variáveis demográficas, foram obtidos dados quanto ao sexo e à idade.

Para as variáveis clínicas, foram obtidas as seguintes informações: se o paciente havia apresentado ou não episódio prévio de PBE nos últimos 12 meses; o número de paracenteses no último mês; se realizou procedimentos invasivos no último mês e quando o fez, qual foi o procedimento; o uso de antibióticos profiláticos e se fez uso de algum outro antibiótico para tratar PBE ou outra infecção no momento da paracentese e, quando em uso, procurou-se saber qual era. Obteve-se, também, dados referentes à etiologia da cirrose e às possíveis complicações da doença hepática. Foi obtido do prontuário o dado referente ao score de Child-Pugh.

Referente às variáveis citológicas, foram coletados dados pertinentes à celularidade do líquido ascítico que compreende a contagem de glóbulos brancos, contagem de glóbulos vermelhos, o valor absoluto de polimorfonuclear (PMN) em  $\text{mm}^3$  e o percentual de polimorfonuclear. No que tange às variáveis microbiológicas, foram coletados dados relacionados à positividade das culturas pelos métodos semi-automatizados e pelo sistema de filtração.

No que tange às variáveis microbiológicas, foram incluídos resultados das culturas pelo método semi-automatizado (A) e pelo método da filtração (B), os volumes inoculados (método semi-automatizado) e filtrados e o resultado da citologia. Foram estimados, também, os valores de sensibilidade e especificidade para cada um dos métodos.

#### **3.1.2 - População de referência e de estudo**

Pacientes adultos (maiores de 18 anos), cirróticos com ascite, com suspeita clínica de Peritonite Bacteriana Espontânea e com confirmação citológica, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, unidades Campus e de Emergência.

### **3.2 - Critérios de inclusão**

Pacientes adultos, admitidos para internação ou advindos dos ambulatórios do HCFMRP-USP Campus ou do pronto atendimento (“box”) da Unidade de Emergência (UE).

#### **3.2.1 - Critérios de exclusão**

Recusa do paciente em participar do estudo ou pacientes com ascite de pequeno volume e não puncionável.

### **3.3 - Delineamento do estudo**

#### **3.3.1 - Tamanho amostral**

Sendo a técnica de filtragem uma proposta pioneira do presente estudo, não pudemos estimar qual seria o seu desempenho em termos de sensibilidade ou especificidade para o diagnóstico microbiológico da PBE. Sendo assim, optamos por utilizar uma amostra de conveniência de 36 pacientes cirróticos para estudar o problema proposto.

#### **3.3.2 - Modelo de estudo**

Foi desenvolvido um estudo do tipo experimental laboratorial.

#### **3.3.3 - Local de estudo**

O estudo foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP), unidade Campus e Emergência. Este local foi eleito por se tratar de um hospital terciário e de referência para Ribeirão Preto e região no diagnóstico e tratamento de doenças complexas.

### **3.4 - Usos dos sistemas do HCFMRP-USP**

Com o propósito de alimentar o banco de dados do Research Electronic Data Capture (REDCap®) para as variáveis clínicas e laboratoriais configurado para a presente pesquisa, foi necessário solicitar ao centro de Informações e Análises (CIA) o uso dos sistemas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O sistema utilizado nesta pesquisa foi ATHOS (Atenção Hospitalar).

### **3.5- Uso do RedCap® (Research Electronic Data Capture)**

O RedCap® (Research Eletronic Data Capture) é uma aplicação Web, bastante segura e prática, que permite ao usuário o gerenciamento e a construção de um formulário para coleta de dados em pesquisas científicas (HARRIS, 2009). Para a presente pesquisa foram realizados formulários próprios, a fim de obter as características demográficas, clínicas, citológicas e microbiológicas dos pacientes incluídos no estudo. Os dados obtidos neste estudo foram coletados e gerenciados usando essa ferramenta e foram hospedados em servidores na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

### **3.6 - Racional teórico**

O processo de análise microbiológico da água utilizando membrana filtrante é rotineiramente empregado para detecção de bactérias heterotróficas. Esse tem como princípio o isolamento e identificação desses microrganismos em amostras cuja concentração é baixa. O método baseia-se na filtração da água, com consequente retenção de bactérias na membrana, seguida de sua inoculação em meio de cultura e posterior incubação desse em condições adequadas. Nesse estudo, valeremos desse conhecimento e da experiência prévia para avaliar e padronizar um método alternativo para o diagnóstico etiológico de PBE em amostras de líquido ascítico.

### **3.7 - Esterilização dos materiais**

Antes mesmo da inclusão dos pacientes e antecedendo os experimentos de padronização e validação do método de filtração, fez-se necessário garantir que todos os materiais empregados estavam estéreis. Para tal, papéis do tipo manilha foram utilizados para envolver os materiais da filtração e os que foram utilizados para os experimentos. Estes passaram pelo método do calor úmido (autoclavagem) a 121 °C por 15 min na autoclave Phoenix Lufenco (Araraquara, Brasil). Para garantia desse processo, foram colocadas, na superfície externa da embalagem, fitas zebradas de controle de esterilização. Somado a isso, em nosso serviço são

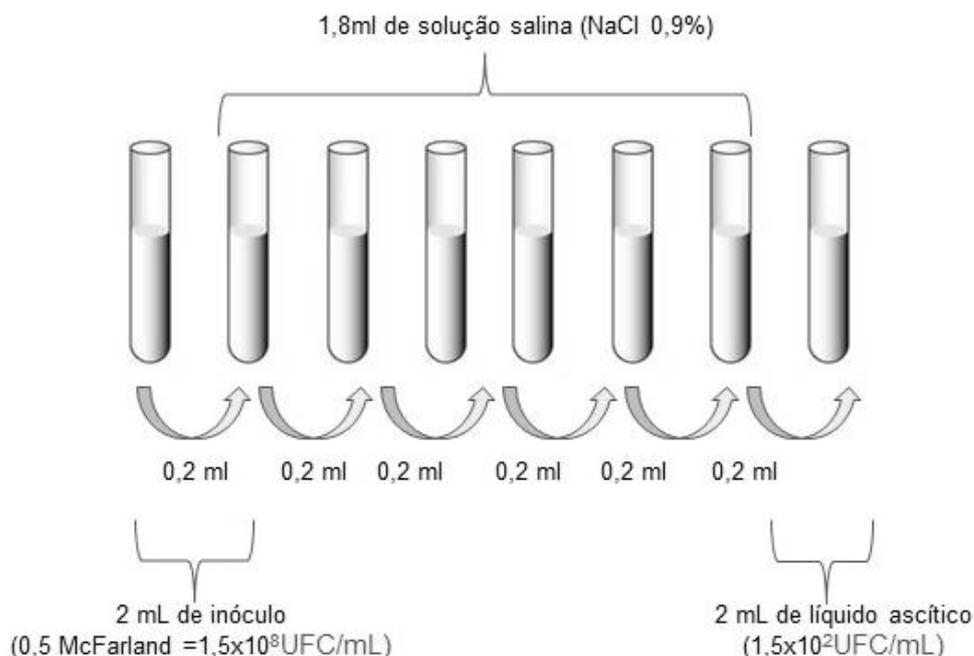
realizados periodicamente testes de controle de esterilidade, de modo a garantir a eficácia desse processo e permitir a confiabilidade da fita.

### 3.8 -Testes pilotos

#### 3.8.1 - Porosidade da membrana

Com o propósito de verificar a melhor porosidade da membrana para a realização do processo de filtragem e verificar qual face apresentava melhor sensibilidade na detecção bacteriana, foram realizados testes pilotos. Estes constituíram em processar líquidos com ausência de suspeita clínica de PBE, porém, com um inóculo bacteriano artificialmente introduzido. O inóculo utilizado foi de  $10^2$ UFC/ml. Para chegar nessa concentração final, foi feita uma turvação de uma ATCC 2918 de *Staphylococcus aureus* em solução de 2 ml em salina estéril a 0,9% e a leitura foi feita com auxílio de um turbidímetro, Densichek (BioMérieux®, França). Uma vez obtida a concentração de 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$ UFC/ml), foram realizadas diluições seriadas até chegar na concentração final (Figura 2).

**Figura 2** – Preparação do inóculo bacteriano. Diluições seriadas do inóculo bacteriano a partir da concentração de 0,5 da escala de McFarland

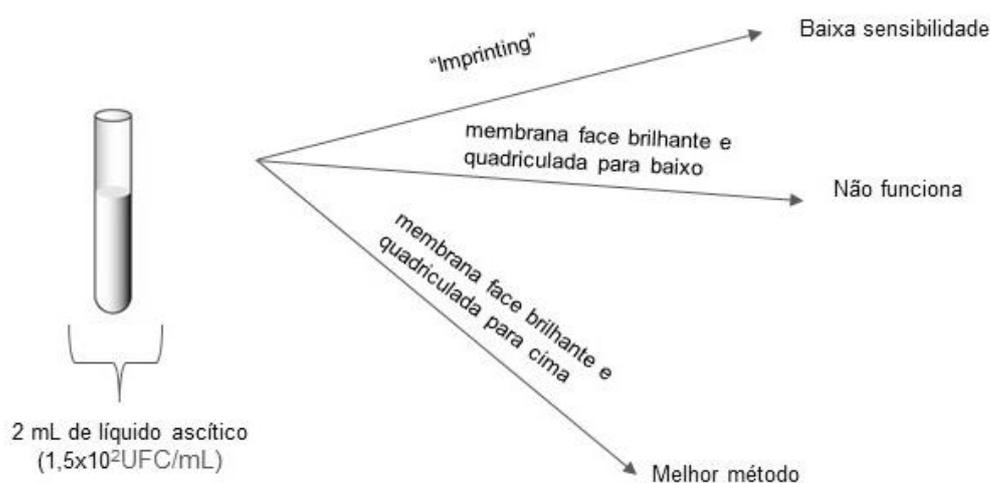


**Fonte:** Autoria própria.

Quanto à porosidade da membrana, inicialmente foi utilizada a de  $0,22\ \mu\text{m}$ , por ser a mais usual em análises de água e que apresenta grande capacidade de retenção bacteriana, porém, pôde-se verificar a rápida saturação dessa com pequenos volumes filtrados. Assim, foi decidida a utilização de uma nova membrana, agora de  $0,45\ \mu\text{m}$ , a qual apresenta resultados mais satisfatórios e pode reter as bactérias de interesse clínico, cujas dimensões são de  $0,5$  a  $1\ \mu\text{m}$  por  $2$  a  $5\ \mu\text{m}$ .

Quanto à posição da membrana, uma vez atingida a concentração final desejada, foram realizados três experimentos, que consistiram em “imprinting”, que consistiu em apenas encostar a membrana no meio de cultura ágar-sangue e rapidamente removê-la, movimento como um carimbo; o segundo experimento consistiu em colocar a membrana com a face quadriculada para baixo; o terceiro e último experimento consistiu em colocar a membrana com a face brilhante voltada para cima. O primeiro experimento apresentou baixa sensibilidade, o segundo não funcionou e o terceiro foi o melhor método, traduzido em maiores contagens bacterianas (Figura 3). Fotos dos resultados das placas a depender da posição da membrana podem ser vistos nas figuras n.º 4 e n.º 5. Por ter sido o melhor método, esse foi o escolhido no presente estudo. A seta na figura n.º 4 indica a colônia bacteriana.

**Figura 3** – Experimento de posição da membrana. Testes de posicionamento da membrana a partir da concentração de 0,5 da escala de McFarland



**Fonte:** Autoria Própria.

**Figura 4** – Técnica de *imprinting*. Resultado da técnica



**Fonte:** Autoria Própria.

**Figura 5** – Membrana com a face lisa e quadriculada para cima.



**Fonte:** Autoria Própria.

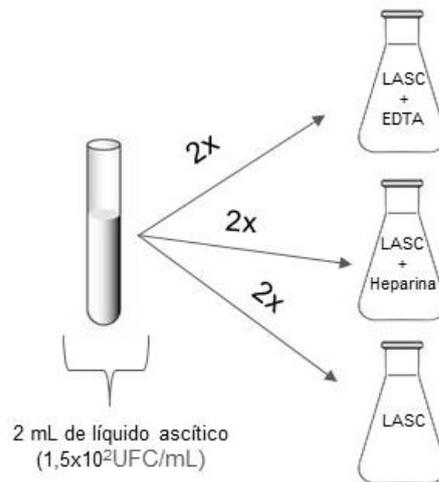
### 3.8.2 - Uso de anticoagulantes

Para verificar se o uso de anticoagulantes poderia intervir nos volumes filtrados, foram realizados, em duplicata, a partir da solução de 0,5 de Mac Farland, com auxílio do turbidímetro, Densichek (BioMérieux®, França), testes com EDTA 0,5

M (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Heparina e sem anticoagulante. Foram divididos três Erlenmeyer com um volume total de 348 ml por unidade e em cada acresceu, respectivamente, EDTA 1M, Heparina e o último foi processado apenas com o líquido ascítico (Figura 6).

**Figura 6** – Experimento de uso de anticoagulantes. Uso de diferentes anticoagulantes no líquido ascítico.

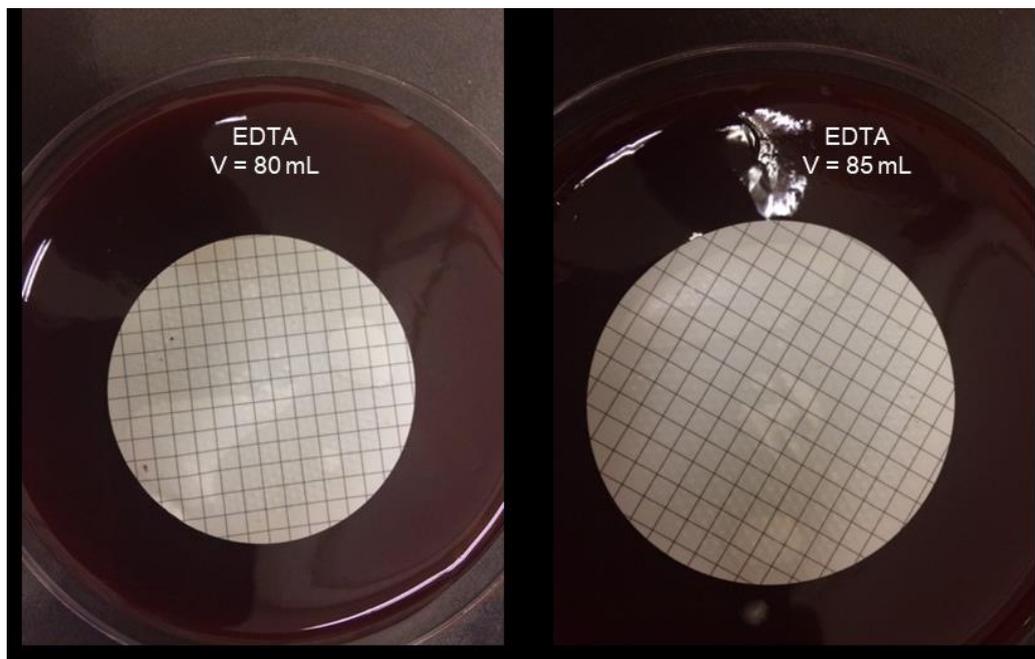
Fonte: Autoria Própria.



A proporção de EDTA utilizada foi de 0,1ml para cada 5 ml de amostra, tendo sido utilizado, nesse experimento, 7 ml. A proporção de Heparina preconizada é de 14U, para cada ml, somando o total de 4900U utilizados. Pode-se notar que o consumo de EDTA é menor, em comparação com a Heparina. Porém, no teste piloto, foram filtrados baixos volumes (80 e 95ml), contudo, maior em relação à Heparina. No frasco em que se utilizou Heparina foram filtrados os menores volumes (35 e 40ml) em relação às amostras de EDTA e sem anticoagulante. O Erlenmeyer, que não fez uso de anticoagulante, apresentou os maiores volumes filtrados (142,5ml e 150ml), portanto foi optado pela não utilização de anticoagulante nas amostras colhidas de líquido ascítico para as análises na presente pesquisa. – (Figura 7, Figura 8 e Figura 9).

**Figura 7** – Uso do EDTA no líquido ascítico

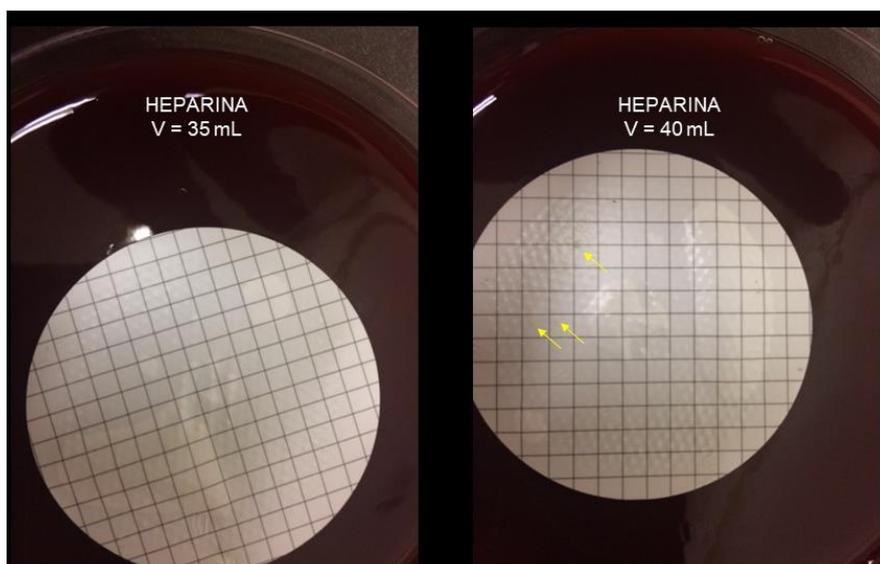
F



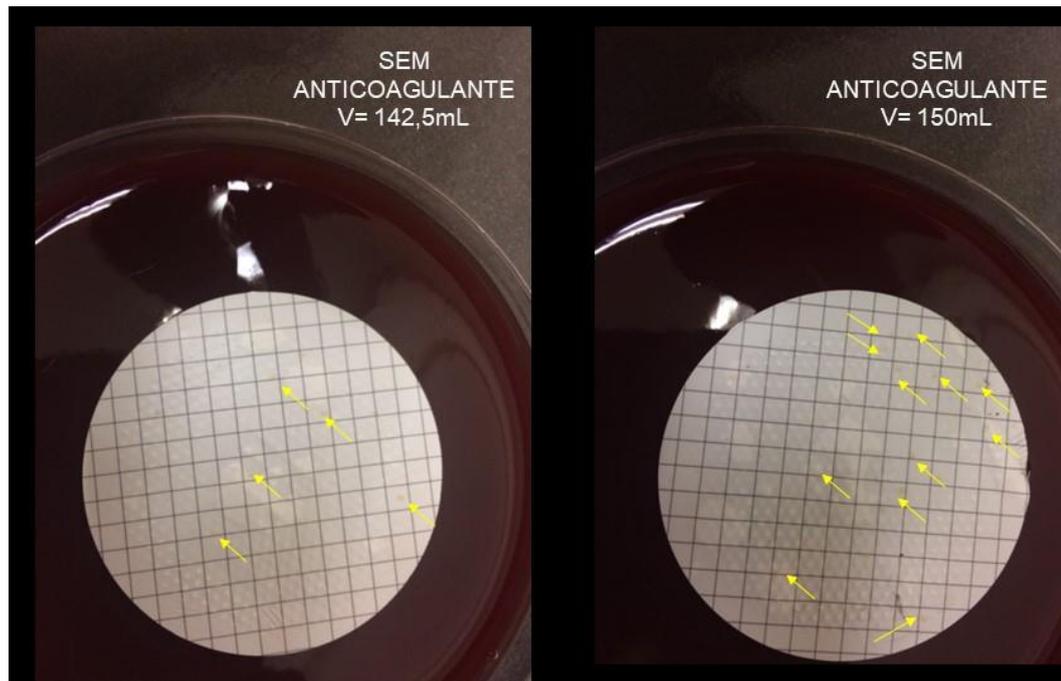
**Fonte:** Autoria Própria.

**Figura 8** – Uso da Heparina sódica no líquido ascítico

F



**Fonte:** Autoria Própria.

**Figura 9** – Filtragem do líquido ascítico sem anticoagulante

Fonte: Autoria própria

### 3.9 - Padronização do processamento do líquido ascítico pelo sistema de filtragem.

#### 3.9.1 - Dos componentes do sistema de filtragem

Os componentes do sistema de filtragem podem ser visualizados na figura 10. Todos eles são compostos de polissulfona. A polissulfona é um polímero resistente e estável em altas temperaturas. O sistema, quando fechado, protege o líquido ascítico, o filtrado e o manipulador de contaminações.

**Figura 10** – Sistema de filtragem e seus componentes.



Legenda: Constituintes do sistema de filtração: funil (1), tampa do funil (2), frasco coletor (3), tampa do frasco coletor (4) e suporte de filtração (5). Autoria própria.

### 3.9.2 - Da bomba a vácuo e da membrana

Para que a filtração fosse realizada, foi necessário acoplar ao sistema de filtração a uma bomba de vácuo (Primar, Brasil), que conferiu uma pressão negativa de  $60\text{kgf/cm}^2$  ao sistema e permitiu a filtração. Além desta, no sistema, foi necessário utilizar uma membrana filtrante (Millipore, Estados Unidos) de  $0,45\ \mu\text{m}$ , estéril, porosa e de nitrocelulose (Figura 11).

**Figura 11** – Exemplo de membrana filtrante de  $0,45\ \mu\text{m}$  empregada nos experimentos de filtração a vácuo do líquido ascítico.



Fonte: Autoria Própria.

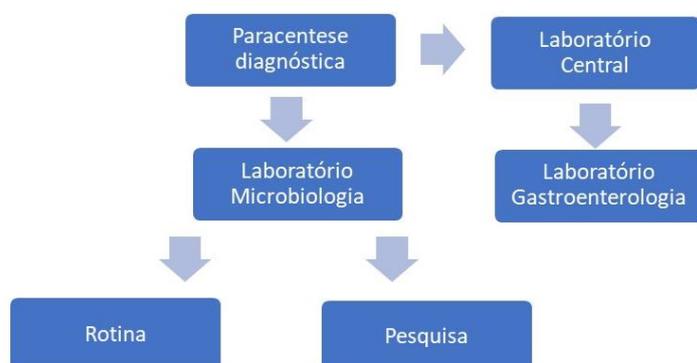
### **3.10 - Inclusão dos pacientes ao estudo**

A inclusão dos pacientes ao estudo foi realizada através da busca ativa de casos tanto na Unidade Campus quanto na Unidade de Emergência. A maioria dos pacientes que foram incluídos na unidade Campus do HCFMRP-USP foram obtidos daqueles que foram agendados para a realização do procedimento na sala de provas funcionais, em dias específicos da semana.

Também foram incluídos pacientes dos diferentes ambulatórios e enfermarias vinculados à divisão de Gastroenterologia do HCFMRP-USP. Procurou-se incluir pacientes da enfermaria do transplante através de busca fonada e essa também foi feita com aqueles pacientes que foram admitidos no “Box” da Unidade de Emergência do HCFMRP-USP.

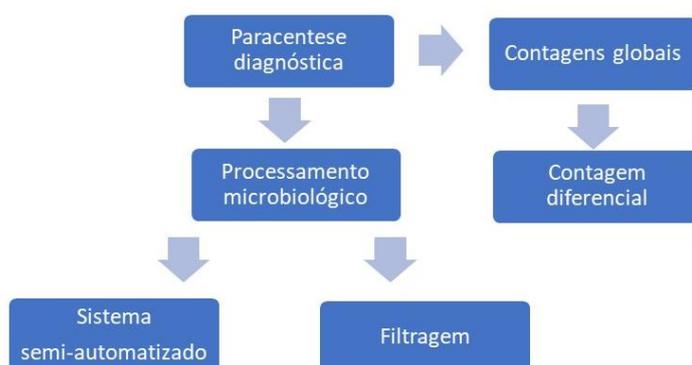
### **3.11 - Obtenção da amostra para contagem celular, para a análise microbiológica e para a pesquisa**

A partir da paracentese diagnóstica, o material foi encaminhado aos laboratórios. Em tubos EDTA a vácuo foi encaminhado inicialmente ao laboratório central do HCFMRP-USP para a realização da contagem global de glóbulos brancos e contagem global de glóbulos vermelhos. Uma vez obtidos esses valores, a mesma amostra foi destinada ao laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP-USP para a realização da contagem diferencial. Um frasco de hemocultura de 10 ml foi encaminhado ao laboratório de Microbiologia do HCFMRP. A amostra da pesquisa também foi obtida nesse momento após o consentimento livre e esclarecido do paciente (Figura 12).

**Figura 12** – Trajeto da amostra nos diferentes laboratórios

**Fonte:** Autoria própria

As contagens globais foram realizadas no aparelho Advia 2120i (Siemens, Alemanha). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita após centrifugação do líquido ascítico e confecção de um esfregaço a partir do sedimento e corado com Giemsa. A amostra encaminhada para análises microbiológicas foi recebida por equipe técnica do laboratório, a qual deu entrada do material e o incubou em Bactec® (Becton Dickinson, Estados Unidos) (Figura 13). Este equipamento a manteve em agitação e monitoramento contínuo por 7 dias a 37 ° C. A leitura foi feita de maneira contínua a cada 10 min. A positividade é acusada através de sensores fluorescentes, que são capazes de detectar a liberação de dióxido de carbono no frasco, produtos do metabolismo bacteriano. As amostras da pesquisa foram transportadas em caixas térmicas e em temperatura ambiente e logo em seguida foram armazenadas em geladeira até o seu processamento. A amostra pode permanecer viável por até 24h.

**Figura 13** – Procedimentos realizados nos laboratórios

**Fonte:** Autoria Própria

### 3.12 - Da filtração propriamente dita, da incubação da amostra e do descarte dos resíduos gerados

A filtração a vácuo do líquido ascítico foi realizada em fluxo laminar, de modo a evitar a contaminação. A pressão negativa conferida pela bomba foi de 60kgf/cm<sup>2</sup>. Na “interface” do Kitassato com o frasco coletor foi colocada, com uma pinça estéril, a membrana. Esse processo de filtração foi realizado até a saturação da membrana, fato esse que pode ser constatado macroscopicamente pela obstrução da passagem do líquido ascítico pelo sistema de filtração. A membrana, então, foi retirada e colocada novamente de maneira asséptica em contato com o meio de cultura ágar - sangue e esse foi incubado em estufa bacteriológica Olidef cz (São Paulo, Brasil) de 24 a 72h a 37 ° C.

Os resíduos da filtração foram descartados em galões plásticos e estes, quando cheios, foram levados para autoclavagem a 121 ° C por 15 min na sessão de materiais sujos, com intuito de eliminar resíduos potencialmente infectantes. Posteriormente, enfim, puderam ser desprezados.

### 3.13 - Identificação do isolado clínico do método da filtração

Após crescimento sobre a membrana filtrante e que estavam em contato com o meio de cultura ágar-sangue, os isolados clínicos foram colocados para identificação. Para esta ser feita, foi necessário realizar inicialmente uma turvação na escala de 0,5 MacFarland. Essa turvação é obtida através da suspensão de colônias bacterianas puras em solução salina a 0,9% e estéril. A turvação foi confirmada através do uso de um turbidímetro DensiCHEK™ Plus (BioMérieux®, França) previamente calibrado com padrões pré-estabelecidos. A partir dessa turvação foram colocados cartões Vitek 2® (BioMérieux®, França) Gram-negativos ou Gram-positivos, a depender da característica morfotintorial da colônia. Os cartões consistem em séries bioquímicas nas quais as bactérias podem ou não fazer uso daqueles compostos. A partir da análise bioquímica, é composto um painel que é característico do gênero e da espécie bacteriana.

### 3.14 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos e sua interpretação

Para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada uma diluição a partir da turvação usada para a identificação. Esta consistiu na transferência de volumes pré-determinados em outra solução salina estéril a 0,9%. Foram colocados cartões de teste de sensibilidade aos antimicrobianos específicos para bactérias Gram-positivas e para Gram-negativas. As Gram-positivas *in vitro* são expostas aos seguintes antimicrobianos: penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, nitrofurantoína, rifampicina, tetraciclina, ciprofloxacino, sulfametoxazol-trimetoprima, linezolida, vancomicina e teicoplanina.

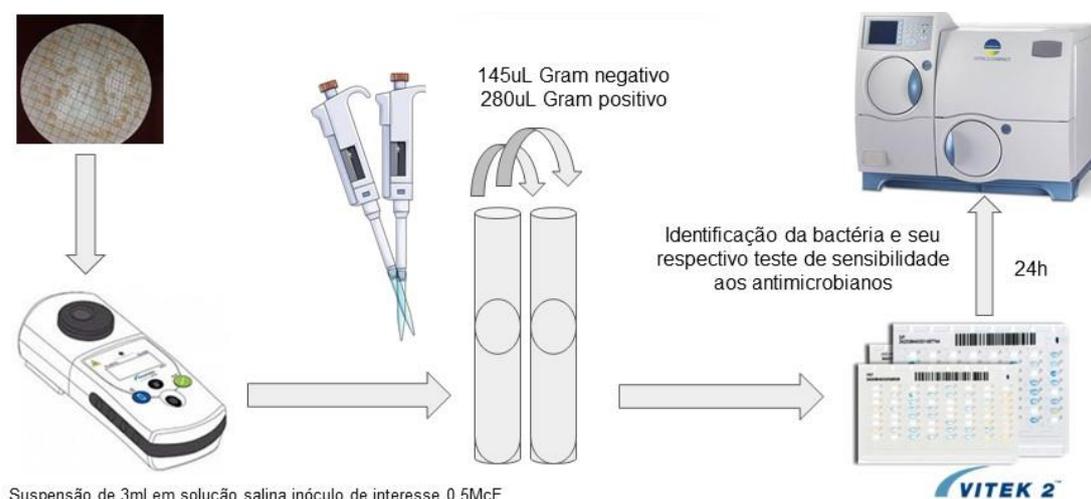
Já as Gram-negativas são expostas a: ampicilina, piperacilizina-tazobactam, cefazolina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, aztreonam, imipinem, meropenem, ampicacina, levofloxacino, gentamicina e tetraciclina

Cada antibiótico testado apresenta diferentes concentrações no cartão e onde a bactéria foi inibida foi possível estimar a concentração inibitória mínima (CIM) (Figura 14).

Esses resultados foram interpretados conforme o padrão proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute M100S (CLSI - M100S, 2016).

O microrganismo, frente aos antimicrobianos após as interpretações, foi liberado como sensível, intermediário ou resistente.

**Figura 14** – Esquema de identificação do agente isolado e do seu respectivo teste de sensibilidade aos antimicrobianos



**Fonte:** Autoria própria

### 3.15 - Aspectos éticos

**3.15.1** - O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola “Joel Domingos Machado” da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, parecer nº 2.198.555;

**3.15.2** - Não se fez necessária a coleta adicional de líquido ascítico, realizada por paracentese. Esse procedimento somente foi realizado em condições em que houve indicação clínica do médico responsável pelo paciente;

**3.15.3** - A coleta de líquido ascítico, por paracentese, por mais raro que seja, apresenta riscos que aqui foram enumerados e que também foram informados ao paciente por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no momento da inclusão do paciente ao estudo. Os possíveis riscos são: infecção no local da punção, hematoma da parede abdominal, perfuração de alças intestinais, distúrbios hidroeletrólíticos e hipovolemia;

**3.15.4** - Os pacientes incluídos na pesquisa estiveram cientes do possível vazamento acidental dos seus dados, porém, o pesquisador responsável se comprometeu pela manutenção do sigilo dos mesmos;

**3.15.5** - Não houve interferência no manejo do paciente em relação à terapia antimicrobiana instituída;

**3.15.6** - Os resultados positivos foram divulgados o quanto antes possível ao médico assistente;

**3.15.7** - Foi solicitada a criação de um biorrepositório específico para o projeto e as amostras biológicas de líquido ascítico dos pacientes foram armazenadas mediante a sua aceitação através de um TCLE redigido de acordo com a resolução 411 de 2011 do Conselho Nacional da saúde do Ministério da Saúde. Essa solicitação teve como propósito a realização de estudos futuros;

**3.15.8** - Nosso estudo está de acordo com a resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional da Saúde do Ministério da Saúde.

## **4. RESULTADOS**

---

#### 4 – RESULTADOS

Foram incluídos 36 pacientes com cirrose hepática, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) no período de novembro de 2017 a junho de 2019.

Houve predominância do sexo masculino (72%). A principal faixa etária encontrada foi de 51 – 60 anos. A maioria (92%) dos pacientes não fizeram uso de antibióticos no momento da coleta para tratamento de PBE ou outra infecção bacteriana (Tabela 1).

Daqueles que fizeram, os antibióticos utilizados foram: levofloxacino, nitrofurantoína e ceftriaxona. Quanto ao episódio prévio, 78% não apresentaram. Dos que apresentaram (22%), todos fizeram uso de norfloxacino como profilaxia secundária.

Majoritariamente (47%) realizaram apenas uma paracentese no último mês e um paciente (3%) realizou 7 paracenteses, dada a gravidade do quadro clínico. O procedimento invasivo mais realizado foi a endoscopia digestiva alta (31%).

**Tabela 1** – Dados clínicos e demográficos dos pacientes cirróticos incluídos no estudo.

<b>Sexo</b>	<b>Quantidade (n=36)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Masculino	26	72
Feminino	10	28
<b>Faixa etária</b>		
30 – 40	1	3
41 – 50	4	11
51 – 60	17	47
61 – 70	8	22
71 – 80	6	17
<b>Uso de antibiótico para tratamento de PBE ou outra infecção bacteriana</b>		
Sim	3	8
Não	33	92

**Tabela 1 (final)** – Dados clínicos e demográficos dos pacientes cirróticos incluídos no estudo.

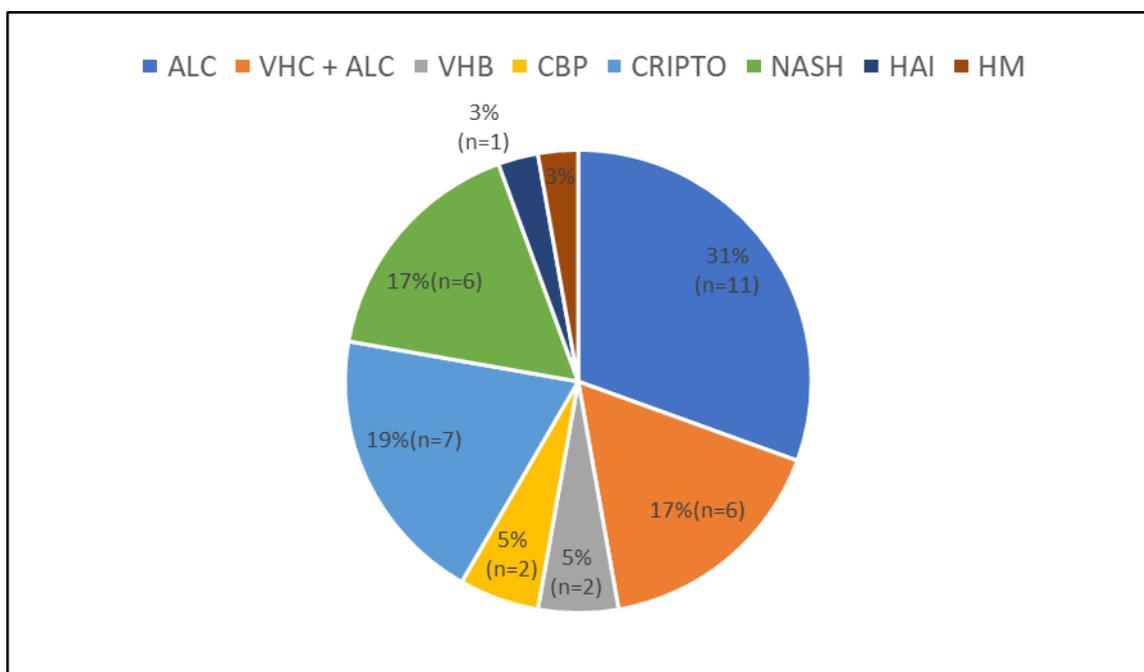
<b>Episódio prévio nos últimos 12 meses</b>	<b>Quantidade (n=36)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Sim	8	22
Não	28	78
<b>Número de paracenteses no último mês</b>		
Não fez	9	25
Uma	17	47
Duas	7	19
Três	2	6
Sete	1	3
<b>Procedimento invasivo no último mês</b>		
Ecoendoscopia	1	3
Colonoscopia	1	3
Endoscopia digestiva alta	11	31
Não fez	23	63

**Fonte:** Autoria Própria.

#### 4.1.1 - Etiologia da Cirrose

A principal etiologia foi a alcoólica (n=11; 31%), seguida, em ordem decrescente de ocorrência, de NASH (n=7; 19%), vírus da hepatite C associado ao álcool (n=6; 17%); para vírus da hepatite B (n=2; 5%); para colangite biliar primária (n=2; 5%); para hepatite autoimune (n=1; 3%) e para hepatite medicamentosa (n=1; 3%) (Figura 15).

**Figura 15** – Distribuição relativa da etiologia envolvida na cirrose dos pacientes incluídos no estudo (n = 36)



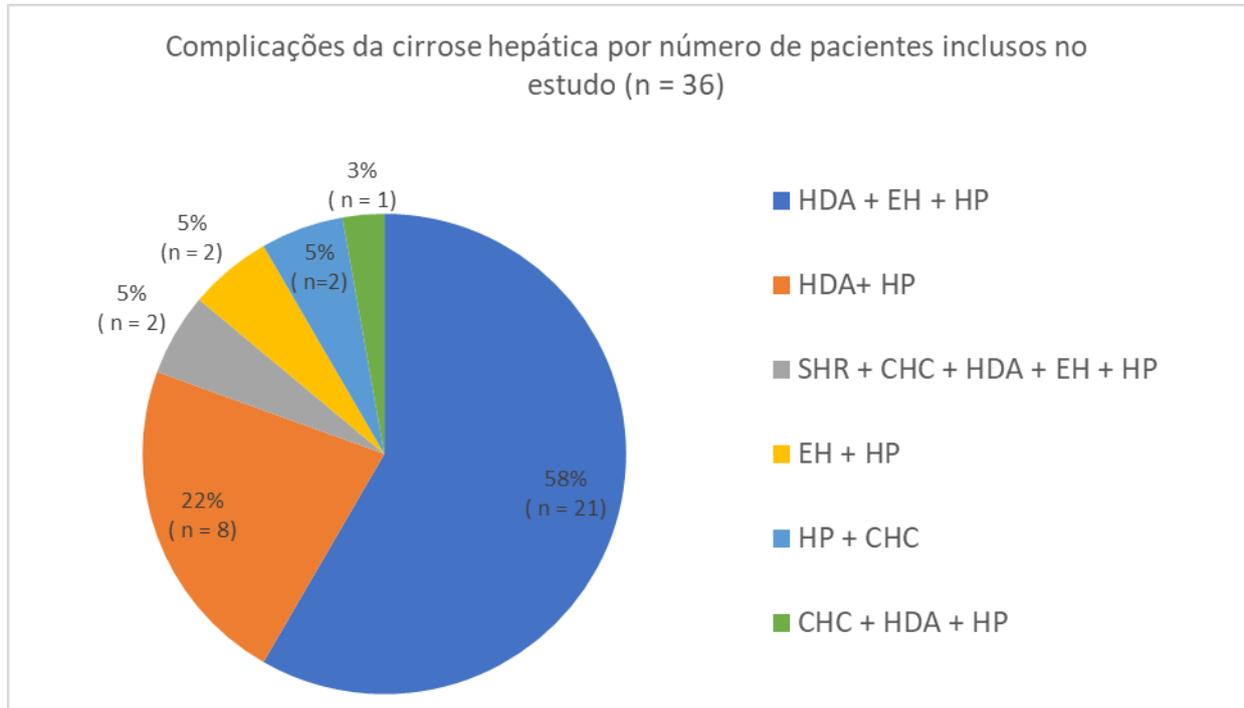
Legenda: **ALC** = álcool; **VHC + ALC** = hepatite C + álcool; **VHB** = vírus da hepatite B; **CBP** = colangite biliar primária; **CRIPTO** = Criptogênica; **NASH** = Esteatohepatite não alcoólica; **HAI** = Hepatite autoimune; **HM** = hepatite medicamentosa. Fonte: Autoria Própria.

#### 4.1.2 - Complicações da Cirrose

A principal complicação encontrada foi a encefalopatia hepática associada a hipertensão portal e associada a hemorragia digestiva alta (n = 21; 58%), seguido de hemorragia digestiva alta associada a hipertensão portal (n= 8; 22%); síndrome hepatorenal associada a carcinoma hepatocelular, hemorragia digestiva alta, encefalopatia hepática e hipertensão portal (n =2; 5%); encefalopatia hepática associada a hipertensão portal (n =2; 5%); hipertensão portal associada a carcinoma hepatocelular (n =2; 5%) Carcinoma

hepatocelular associado a hemorragia digestiva alta e hipertensão portal (n=1 ; 3%) (Figura 16).

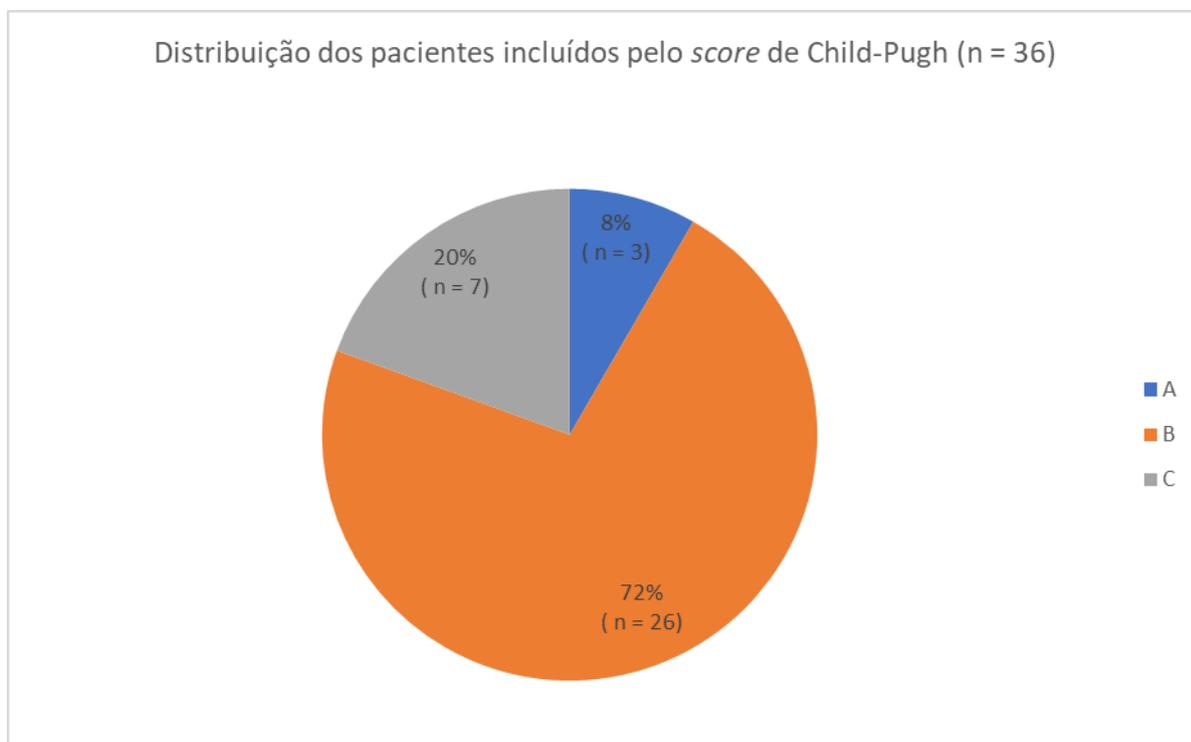
**Figura 16** – Complicações da cirrose hepática por número de pacientes incluídos no estudo (n = 36)



Legenda: **HDA + EH + HP** = Hemorragia digestiva alta + encefalopatia hepática + hipertensão portal ; **HDA + HP** = Hemorragia digestiva alta + hipertensão portal ; **SHR + CHC + HDA + EH + HP** = Síndrome hepatorenal + Carcinoma hepatocelular + hemorragia digestiva alta + encefalopatia hepática + hipertensão portal ; **EH + HP** = encefalopatia + hipertensão portal ; **HP + CHC** = hipertensão portal + carcinoma hepatocelular ; **CHC + HDA + HP** = Carcinoma hepatocelular + hemorragia digestiva alta + hipertensão portal. Autoria própria.

#### 4.1.3 SCORE de CHILD PUGH

A maioria dos pacientes (72%) apresentaram Child-Pugh score B. A minoria obteve score A de Child-Pugh (8%) (Figura 17).

**Figura 17** – Distribuição dos pacientes incluídos pelo score de Child-Pugh (n=36)

**Fonte:** Autoria Própria.

## 4.2 - VARIÁVEIS CITOLÓGICAS

Dos 36 pacientes incluídos, 17 (47,2%) apresentaram citologia sugestiva de PBE. Houve 5 casos em que foi necessária a correção do valor dos polimorfonucleares (PMNs) dada a presença de glóbulos vermelhos (GV) no líquido ascítico (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultado dos glóbulos brancos, porcentagem de PMN, valor absoluto de PMN, glóbulos vermelhos expressos em mm<sup>3</sup> e PMN corrigido dos líquidos ascíticos incluídos no estudo.

Registro REDCap®	Glóbulos Brancos (mm <sup>3</sup> )	Porcentagem de polimorfonucleares	Número absoluto de polimorfonucleares	Glóbulos vermelhos (mm <sup>3</sup> )	Polimorfonucleares corrigidos
1	301	20	60.2	-	-
2	50	-			-
3	242	-	-	-	-
4	106	-	-	-	-
5	75	-	-	-	-
10	81	-			-
11	258	64	165.12	-	-
12	51	-			-
14	263	31	81.53	-	-
15	209	-			-
16	133	-	-	-	-
21	2801	95	2660.95	-	-
24	66	-	-	-	-
25	241	-	-	-	-
27	119	-	-	-	-
30	3576	97	3468.72	-	-
31	172	-	-	-	-
33	63	-	-	-	-
35	192	-	-	-	-
36	71	-	-	-	-
40	1348	88	1186.24	-	-
41	8761	91	7972.51	-	-

**Tabela 2 (final)** - Resultado dos glóbulos brancos, porcentagem de PMN, valor absoluto de PMN, glóbulos vermelhos expressos em mm<sup>3</sup> e PMN corrigido dos líquidos ascíticos inclusos no estudo.

<b>Registro REDCap®</b>	<b>Glóbulos Brancos (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Porcentagem de polimorfonucleares</b>	<b>Número absoluto de polimorfonucleares</b>	<b>Glóbulos vermelhos (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Polimorfonucleares corrigidos</b>
46	3000	73	2190	500	2188
47	300	13	39	600	36.6
48	6600	83	5478	100	5477.6
49	557	65	362.05	1	362.046
50	796	88	700.48	59.000	464.48
51	676	67	452.92	1	452.916
53	788	48	378.24	1	378.236
54	4943	86	4250.98	1	4250.97
55	487	59	287.33	1	287.32
56	390	97	378.3	1	378.29
58	808	83	670.64	1	670.63
60	1531	82	1255.42	1	1254.16
61	5651	91	5142.41	1	5142.40
62	829	79	654.91	16.000	590.91

### **4.3 - VARIÁVEIS MICROBIOLÓGICAS**

Na tabela 3 são apresentados o registro do paciente no REDCap®, o volume inoculado no sistema semi-automatizado em mililitros resultado da citologia, microrganismo isolado pelo método semi-automatizado, volume filtrado em mililitros e microrganismo pelo método da filtração. O menor volume filtrado foi 20 ml, o maior foi de 420ml e o volume médio filtrado foi de 75 ml.

**Tabela 3** – Registro dos pacientes no REDCap®, volume inoculado no sistema semi-automatizado em mililitros, resultado da citologia, microrganismo isolado pelo método semi-automatizado, volume filtrado em mililitros e microrganismo pelo método da filtração.

Registro REDCap®	Resultado Citologia	Microrganismo isolado pelo método semi-automatizado	Volume inoculado (ml)	Microrganismo pelo método da filtração	Volume filtrado (ml)
1	Negativa	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40
2	Negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	Não houve isolamento	100
3	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	75
4	Negativa	<i>Streptococcus</i> alfa-hemolíticos	10	Não houve isolamento	50
5	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	250
10	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
11	Negativa	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	10	Não houve isolamento	35
12	Negativa	Não houve isolamento	10	<i>Moraxella catarrhalis</i>	60
14	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	200
15	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	250
16	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
21	Positiva	<i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico	10	<i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico	250
24	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	250
25	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	22
27	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	410
30	Positiva	<i>Escherichia coli</i>	10	<i>Escherichia coli</i>	20
31	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
33	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	50
35	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	25

**Tabela 3 (final)** – Registro dos pacientes no REDCap®, volume inoculado no sistema semi-automatizado em mililitros, resultado da citologia, microrganismo isolado pelo método semi-automatizado, volume filtrado em mililitros e microrganismo pelo método da filtração.

Registro REDCap®	Resultado Citologia	Microrganismo isolado pelo método semi-automatizado	Volume inoculado (ml)	Microrganismo pelo método da filtração	Volume filtrado (ml)
40	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	130
41	Positiva	<i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico	10	Não houve isolamento	70
46	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	35
47	Negativa	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
48	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
49	Positiva	<i>Bacillus</i> spp.	10	Não houve isolamento	20
50	Positiva	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	Não houve isolamento	20
51	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
53	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
54	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
55	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
56	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
58	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
60	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20
61	Positiva	<i>Enterobacter</i> spp.	10	Não houve isolamento	20
62	Positiva	Não houve isolamento	10	Não houve isolamento	20

**Fonte:** Autoria Própria.

O método semi-automatizado isolou quatro microrganismos que foram considerados falsos positivos, visto que a citologia estava negativa. Esse mesmo método foi capaz de detectar cinco verdadeiros positivos. O isolado *Bacillus* spp., embora identificado, é considerado como contaminante.

O método da filtração foi capaz de isolar dois microrganismos considerados verdadeiros positivos e dois falsos positivos.

**Tabela 4** – Avaliação da sensibilidade e especificidade das culturas semi-automatizada e após filtração do líquido ascítico em relação ao padrão-ouro (citologia) do diagnóstico de PBE.

Cultura / Citologia	Cultura semi-automatizada		Cultura filtração	
	positiva	negativa	positiva	negativa
Citologia positiva	6	11	2	15
Citologia negativa	4	15	2	17
Sensibilidade	35,30%		11,80%	
Especificidade	78,90%		89,50%	

## 5. DISCUSSÃO

---

## 5. DISCUSSÃO

A cirrose hepática é o estágio final da doença hepática e é o resultado da agressão crônica desse órgão, sendo caracterizada pela hipertensão portal com consequente formação da ascite. Esse líquido comumente é infectado, sem fontes visíveis de infecção, o que é intitulado de PBE. A cirrose hepática é uma doença de curso insidioso que acomete predominantemente homens de meia idade.

Essa afirmação pôde ser comprovada em um estudo brasileiro que procurou analisar características epidemiológicas de indivíduos cirróticos em um centro de especialidades médicas em Belém, no qual a faixa etária e sexo predominante foi, respectivamente, de 50 a 59 anos e masculino. (KELLY; COSTA; BRILHANTE, 2016).

Essa constatação também foi verificada em um estudo paquistanês no qual procurou-se caracterizar complicações e prognósticos de pacientes cirróticos. A média de idade desses pacientes foi 53,08 anos e o sexo masculino foi o mais frequente (ALMANI et al., 2008).

Em um hospital de Singapura, a média de idade dos pacientes com cirrose hepática incluídos no estudo foi de 60,9 anos, também com predomínio de homens (JASON CHANG et al., 2015).

Em um estudo realizado na região Sul do Brasil, a maioria encontrada foi de homens e a média de idade encontrada foi de 54,2 anos (POFFO et al., 2009).

Também Thanopoulou e colaboradores (2002), em um trabalho Ateniense que avaliou cirróticos com ascite e que desenvolveram PBE, encontrou predomínio de pacientes do sexo masculino e com média de idade de 58,4 anos.

Em nosso trabalho, a média de idade e a faixa etária predominante foram bastante semelhantes, sendo respectivamente 60,1 anos e de 51 a 60 anos. Houve também o predomínio do sexo masculino (72%).

As etiologias que estão envolvidas na progressão da doença hepática para a cirrose podem ser agrupadas nas seguintes principais categorias: metabólicas, virais, alcoólicas, induzidas por medicamentos, autoimunes, biliares e Criptogênicas, ou seja, quando a causa não é determinada.

Em Singapura, por ser um país multiétnico, contemplando Chineses, Malaios e Indianos, apresentou-se como causa majoritária de cirrose a hepatite B crônica. A etiologia alcoólica foi a segunda causa de cirrose nesse mesmo estudo, sendo mais

comum entre os Indianos e Chineses e ausente nos Malaios (JASON CHANG et al., 2015).

Indivíduos Afro Americanos com menos de 40 anos apresentaram hepatite autoimune como uma das principais causas de cirrose. A principal causa de cirrose em indivíduos hispânicos é a cirrose Criptogênica (SAIJA et al., 2014).

É frequente encontrar a associação entre o consumo de álcool e as hepatites virais, sobretudo pelo vírus da hepatite C (TAYLOR et al., 2016).

Nossos dados corroboram a literatura descrita para os países do ocidente, sendo que a principal etiologia encontrada entre os cirróticos foi a alcoólica, seguida do vírus hepatite C associado ao álcool.

Ainda que as características demográficas e clínicas sejam muito bem descritas, o diagnóstico etiológico apresenta-se bastante falho, com métodos pouco sensíveis e ineficientes, na grande maioria das vezes, na detecção dos agentes etiológicos das PBEs.

A sensibilidade do diagnóstico etiológico, quando se faz o uso beira-leito do método semi-automatizado em pacientes com PBE, é variável e baixa. As variações das sensibilidades encontradas na literatura foram de 20% a 66,7% (ADAMCOVÁ-SELCANOVÁ.S et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018; AN et al., 2019; ARDOLINO; WANG; PATWARDHAN, 2019; FRIEDRICH et al., 2016; OLADIMEJI et al., 2013; THIELE et al., 2014).

A baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos culmina na prescrição de terapias antimicrobianas empíricas, fazendo uso de antibióticos de amplo ou restrito espectro, que pode acarretar prejuízos diretos aos pacientes.

No que se refere aos prejuízos aos pacientes, em um estudo em que os cirróticos foram divididos em dois grupos, um de pacientes que receberam antibióticos de amplo espectro e outro que receberam antibióticos de espectro restrito, o grupo dos que receberam antibióticos de amplo espectro, em relação ao dos que receberam antibióticos de espectro restrito, apresentou uma mortalidade superior em 90 dias, os pacientes deste apresentaram em média maior comorbidades e foram mais propensos a terem um *score* de MELD (do inglês, modelo para doença hepática terminal) mais elevado em outras admissões hospitalares (ARDOLINO; WANG; PATWARDHAN, 2019).

Em um trabalho que procurou avaliar os desfechos de culturas positivas e negativas em pacientes com cirrose de etiologia viral, 187 pacientes foram incluídos

no estudo, sendo que 44 (23,5%) apresentaram PBE. Desses, 13 isolados (29,5%) foram resistentes a antibióticos de primeira linha e 8 (61,5%) pacientes que apresentaram esses isolados morreram devido ao atraso na instituição da terapia antimicrobiana apropriada. Ainda que a mortalidade no grupo com PBE e com cultura positiva seja superior ao grupo com ascite neutrofílica cultura negativa, este último apresenta uma mortalidade que não é desprezível nesse estudo, a qual foi de aproximadamente 10% (KAMANI et al., 2008).

Somado a isso, o advento da multidroga resistência tem sido um cenário preocupante, até mesmo naqueles pacientes que apresentaram episódios de infecções adquiridas na comunidade, reflexo do uso indiscriminados de antibióticos e limitação no desenvolvimento de novos antimicrobianos (ACEVEDO, 2015).

Em um estudo em que foram avaliados dois períodos, sendo o primeiro de 2005 a 2007 e o segundo de 2010 a 2011, pôde-se observar que no primeiro período as PBEs foram responsáveis por cerca de um quarto das infecções contempladas no estudo (126 em 507). Das 126 PBEs, 116 se apresentaram sensíveis ou não houve isolamento do microrganismo, dessas 104 (90%) apresentaram resoluções com a terapia antimicrobiana proposta. Contudo, 17 (15%) das 116 apresentaram mortalidade hospitalar. Houve também 10 isolados de bactérias multidroga resistentes, sendo que metade destas evoluíram para óbito. No período de 2010 a 2011, 162 casos de infecções bacterianas foram detectadas, dos quais 33 (20,3%) foram por PBE, tendo sido isoladas bactérias produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido e *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (FERNÁNDEZ et al., 2012).

Em uma meta-análise que procurou avaliar se as cefalosporinas de terceira geração ainda permaneceriam como antibióticos de primeira linha, observou-se que, das 1074 culturas positivas de líquido ascítico, 462 eram PBEs nosocomiais em que 251 (54,3%) apresentavam-se resistentes a esses antibióticos, e nas PBEs adquiridas na comunidade, por sua vez, 612 eram positivas com 207 (33,8%) de resistência as cefalosporinas de terceira geração.

Somado a isso, há uma tendência crescente na identificação de bactérias Gram-positivas nas etiologias das PBEs. Na América do Sul essa frequência está em 63,6% das culturas, enquanto que na América do Norte ela varia de 57,1% a 73,9%, na Europa de 20,3% a 68,3%, na África de 31,8% a 73,2% e na Ásia de 16,7% a 53% (FIORE et al., 2017).

Frente a esse cenário de baixa sensibilidade de culturas, da crescente falha da terapia empírica e do fenômeno crescente da multidroga resistência, o presente estudo procurou, de maneira inédita, validar o método de filtragem a vácuo para amostras biológicas, em particular para o líquido ascítico.

O método utilizado em relação ao semi-automatizado utiliza materiais simples, baratos, de fácil manipulação e reutilizáveis, com exceção da membrana filtrante. Ainda que apresente tais vantagens, a baixa sensibilidade deste em relação ao semi-automatizado torna seu uso restrito, possivelmente, aos locais que não dispõem dos aparelhos semi-automatizados.

Essa baixa sensibilidade pode ser resultado da combinação de um baixo inóculo bacteriano, com a presença concomitante de células imunes e sanguíneas no líquido.

Apesar da baixa sensibilidade dessa técnica, os microrganismos isolados e identificados foram, em sua maioria, concordantes com os identificados no método semi-automatizado e vão ao encontro dos patógenos esperados na PBE. Isso também se aplica aos que foram somente isolados pelo método semi-automatizado.

Nosso estudo encontrou, além da limitação do método, limitação na distinção das PBEs comunitárias e PBEs relacionadas a assistência à saúde. Isso provavelmente deve-se ao fato de que o local de realização do estudo recebe pacientes de muitas regiões as quais são contempladas no distrito regional de saúde XIII. Portanto, esses pacientes careceriam de um acompanhamento mais minucioso.

Em vista das limitações de sensibilidade da técnica estudada, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas que visem a otimização do diagnóstico microbiológico dos episódios de PBE. Como consequência disso, terapias antimicrobianas mais assertivas poderão ser instituídas, resultando possivelmente em maior sobrevida do paciente cirrótico e menor indução do desenvolvimento da resistência bacteriana.

---

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou e padronizou o processo de filtração a vácuo do líquido ascítico para o diagnóstico etiológico da PBE, confirmando sua viabilidade técnica. Entretanto, a sensibilidade diagnóstica da filtração foi inferior à do método padrão (semi-automatizado) o que limita a sua utilidade nos centros que dispõem de recursos para a realização do mesmo. Assim, entendemos necessário o desenvolvimento de novas técnicas que visem a otimização do diagnóstico microbiológico dos episódios de PBE, de modo a orientar a terapia antimicrobiana nos pacientes acometidos por essa grave infecção.

---

## **7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J. **Multiresistant bacterial infections in liver cirrhosis: Clinical impact and new empirical antibiotic treatment policies.** World Journal of Hepatology, v. 7, n. 7, p. 916–921, 2015.

ARDOLINO, E.; WANG, S. S.; PATWARDHAN, V. R. **Evidence of Significant Ceftriaxone and Quinolone Resistance in Cirrhotics with Spontaneous Bacterial Peritonitis.** Digestive Diseases and Sciences, 2019.

BAE, S. et al. **Clinical characteristics and outcomes of spontaneous bacterial peritonitis caused by Enterobacter species versus Escherichia coli: a matched case-control study.** BMC Infectious Diseases, 16 (2016): 252. PMC.

BENNETT, John E; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. Mandell, Douglas, and Bennett's **principles and practice of infectious diseases.** 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015

BENZAKEN, A. et al. Hepatitis C elimination by 2030 is feasible in Brazil: a mathematical modelling approach. **Journal of Hepatology**, [S.l.], v. 68, p. S193, 1 abr. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico** - Hepatites virais. v. 15, p. 1–72, 2016.

CHEONG, H. S. et al. **Clinical Significance and Outcome of Nosocomial Acquisition of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Patients with Liver Cirrhosis.** Clinical Infectious Diseases, v. 48, n. 9, p. 1230–1236, 2009.

CHOLONGITAS, E. et al. **Increasing frequency of Gram-positive bacteria in spontaneous bacterial peritonitis.** Liver International, v. 25, n. 1, p. 57–61, 2005.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI document M100S** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne; 2016

CONN HO, FESSEL JM. **Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme.** *Medicine* 1971; 50:161-97

DING, X. et al. **Causative agents and outcome of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients : community-acquired versus nosocomial infections.** p. 1–8, 2019

EKPANYAPONG, S. **Infections in Cirrhosis.** p. 254–270, 2019.

FERREIRA, C. T. **Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção: Hepatites virais** v. 7, n. 4, p. 473–487, 2004.

FERNÁNDEZ, J. et al. **Bacterial infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis.** Hepatology, v. 35, n. 1, p. 140–148, 2002.

GUEDES, R. R.; KIELING, C. O. **Spontaneous bacterial peritonitis: new perspectives.** Revista da AMRIGS, v. 56, n. 3, p. 260–267, 2012.

FERNÁNDEZ, J. et al. **Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: A prospective study.** *Hepatology*, v. 55, n. 5, p. 1551–1561, 2012.

FIORE, M. et al. **Are third-generation cephalosporins still the empirical antibiotic treatment of community-Acquired spontaneous bacterial peritonitis? A systematic review and meta-Analysis.** *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 30, n. 3, p. 329–336, 2018.

FIORE, M. et al. **Current concepts and future strategies in the antimicrobial therapy of emerging Gram-positive spontaneous bacterial peritonitis.** *World Journal of Hepatology*, v. 9, n. 30, p. 1166–1175, 2017.

KAMANI, L. et al. **Outcomes in culture positive and culture negative ascitic fluid infection in patients with viral cirrhosis: Cohort study.** *BMC Gastroenterology*, v. 8, p. 1–6, 2008.

HARRIS PA, Taylor R, Thielke R, Payne, J.Gonzalez N, Conde JG. **Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support.** *J.Biomed Inform* 2009;42(2):377-81

LUTZ, P. et al. **Spontaneous bacterial peritonitis: The clinical challenge of a leaky gut and a cirrhotic liver.** *World Journal of Hepatology*, v. 7, n. 3, p. 304–314, 2015.

LUTZ, P. et al. **Antibiotic resistance in healthcare-related and nosocomial spontaneous bacterial peritonitis.** *European Journal of Clinical Investigation*, v. 47, n. 1, p. 44–52, jan. 2017.

MATTOS, Angelo A. de et al. **Infecção bacteriana no paciente cirrótico.** *Arq. Gastroenterol.*, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 11-15, Mar. 2003 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0004-28032003000100003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-28032003000100003&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em 4 de julho.

MEDINA, J. et al. **Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis.** *Diabetes Care*, v. 27, n. 8, p. 2057–2066, 2004.

MOORE, K. P.; AITHAL, G. P.; MOORE, K. **Guidelines on the management of ascites in cirrhosis.** *Gut*, v. 55, p. 1–12, 2006.

NOVOVIC, S. et al. **First-line treatment with cephalosporins in spontaneous bacterial peritonitis provides poor antibiotic coverage.** v. 5521, 2017

REGINATO, T. J. B. et al. **Characteristics of ascitic fluid from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis in emergency units at a tertiary hospital.** *São Paulo Medical Journal*, v. 129, n. 5, p. 315–319, 2011.

RUNYON.BA. **Management of adult patients with ascites due to cirrhosis.** *Hepatology*. p.264- 72, 1998

Sociedade Brasileira de Hepatologia – **Manual de perícia médica do ministério da saúde** –II edição. Disponível em: <[https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/manual\\_hepatopatia\\_grave/](https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/manual_hepatopatia_grave/)>. Acesso em 27 de agosto

SOUZA, S.S. I **Cirrose Hepática**. Revista Brasileira de Medicina, v..67, n.4, p111-120, 2010

STRAUSS, E. **The impact of bacterial infections on survival of patients with decompensated cirrhosis**. *Annals of Hepatology*, v. 13, n. 1, p. 7–19, 2014.

TAYLOR, A. L. et al. **Association of Hepatitis C Virus With Alcohol Use Among U.S. Adults:**

**NHANES 2003–2010**. American Journal of Preventive Medicine, v. 51, n. 2, p. 206–215, 2016.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, [S.l.], v. 61, n. 1, Suppl, p. S58-68, nov. 2014.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Hepatitis C [On-line]**. Atualizado 18 jul. 2018. Disponível em : <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 14 julho. 2019.



## 8. APÊNDICE

### 8.1. Aprovação do comite de ética



**CENTRO DE SAUDE ESCOLA  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**OF. 022/2017-CEP/CSE-FMRP-USP**

Ribeirão Preto, 03 de Agosto de 2017.

Prezado Senhor

Comunicamos que o projeto de pesquisa abaixo especificado foi analisado e **APROVADO** "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na data de 02 de Agosto de 2017.

**CAAE: 69751317.5.0000.5414**

**Projeto de Pesquisa: "Uso da filtragem e da centrifugação como formas de aumentar a sensibilidade das culturas de líquido ascítico para o diagnóstico etiológico das peritonites bacterianas espontâneas em portadores da cirrose hepática."**

**Pesquisador: Lucas Chaves**

Em atendimento à Resolução 466/12, deverá ser encaminhado a este CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Laércio Joel Franco  
Coordenador do CEP/CSE-FMRP-USP

**Ilmo. Prof. Dr. Fernando Bellíssimo Rodrigues**  
**Docente do Departamento de Medicina Social**  
**da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP**

**8.2. Parecer – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - Unidade de Emergência**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**UNIDADE DE EMERGÊNCIA**  
**CENTRO DE ESTUDOS DE EMERGÊNCIA EM SAÚDE**



Fone: (16) 36021225 / Fax: (16) 36021248  
cees@hcrp.fmrp.usp.br www.hcrp.fmrp.usp.br

Rua Bernardino de Campos, 1000  
14015-130 Ribeirão Preto SP

**CENTRO DE ESTUDOS DE EMERGÊNCIA EM SAÚDE DA U.E.- HCFMRP-USP****PARECER**

O trabalho intitulado **“Uso da filtragem como forma de aumentar a sensibilidade da cultura de líquido ascítico para o diagnóstico etiológico das peritonites bacterianas espontâneas em portadores de cirrose hepática”**, apresentado sob a responsabilidade do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Fernando Bellissimo Rodrigues como Projeto de Pesquisa a ser realizado na Unidade de Emergência, pelo pós graduando Departamento de Medicina Social Lucas Chaves, foi aprovado pelo Centro Integrado de Emergências em Saúde (CIES).

Ribeirão Preto, 22 de agosto de 2017.

  
**Prof. Dr. OCTÁVIO MARQUES PONTES NETO**  
Coordenador do CEES UE-HCFMRP-USP