

Lais Del Prá Netto Machado

**PNEUMONIA BACTERIANA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE:
AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E
PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA
DETECÇÃO DE *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*
E *Streptococcus pneumoniae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero

Coorientador: Prof. Dr. Caio Mauricio Mendes de Cordova

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Lais Del Prá Netto

Pneumonia bacteriana adquirida na comunidade : avaliação clínico-epidemiológica e padronização de métodos moleculares para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* / Lais Del Prá Netto Machado ; orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero ; coorientador, Caio Mauricio Mendes de Cordova. - Florianópolis, SC, 2015.
124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Pneumonia adquirida na comunidade. 4. Métodos moleculares. 5. *Mycoplasma pneumoniae*. I. Sincero, Thaís Cristine Marques. II. Cordova, Caio Mauricio Mendes de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Lais Del Prá Netto Machado

**PNEUMONIA BACTERIANA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE:
AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E
PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA
DETECÇÃO DE *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*
E *Streptococcus pneumoniae*.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de julho de 2015.

Prof^a. Tania Beatriz Creczynski Pasa, Dr^a.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Thaís Cristine Marques Sincero, Dr^a.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Izabella Thaís da Silva, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria Cláudia Santos da Silva, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha família que sempre me encorajou e me incentivou a prosseguir neste trajeto, apesar das dificuldades.

À minha orientadora Thaís e meu coorientador Caio, que apesar dos imprevistos que surgiram, não desistiram de me apoiar e acreditar no meu trabalho. Por compartilharem parte do grande conhecimento que possuem, tornando-me uma pessoa e profissional melhor.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia (PPGFar/UFSC) pela oportunidade de realizar este projeto, ao corpo docente pelas disciplinas cursadas e a todos os auxiliares administrativos.

Aos meus avós maternos, Waldyr e Helga (*in memoriam*), que além do incentivo e orgulho, fizeram de sua casa a minha casa neste período de mestrado.

Aos meus avós paternos, Machadinho e Maria, que apesar das poucas visitas, compreenderam o motivo de minha ausência e sempre me apoiaram.

Aos meus pais, Mauro e Denise, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram neste percurso. Por me ensinarem a ser uma pessoa melhor e dar o melhor de mim em todos os meus objetivos. Por serem meu motivo de orgulho e por me espelhar neles. À minha irmã, Camila, por estar ao meu lado por 26 anos, sendo uma companhia e amiga neste tempo todo.

À minha família, meus tios e primos pelo encorajamento e apoio.

Ao Professor Dr. Celso Spada, que me proporcionou a entrada no programa e que por um ano e meio esteve ao meu lado nesta jornada.

À minha orientadora, Prof^{ra}. Dr^a. Thaís Sincero, que me acolheu em seu laboratório, e que com sua calma e conhecimento me passou segurança para acreditar em meu potencial e trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Caio Cordova, que tem sido meu exemplo de pessoa e profissional, sempre me incentivando a fazer meu melhor. Este trabalho não teria sido o mesmo sem a sua ajuda e conhecimento.

Ao Hospital e pacientes que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Praun, responsável pelo pronto-atendimento onde as coletas foram realizadas.

Aos pneumologistas: Dr^a. Marianne e Dr. Marcel.

Ao corpo clínico do pronto-atendimento. Aos médicos: Dr^a. Renata, Dr. Christian, Dra. Bianka, Dr^a. Priscila, Dr^a. Gaby, Dr. Antônio Lanna, Dr^a. Joana, Dr^a. Natália, Dr. José Carlos. Aos enfermeiros: Andréia, Manu Gobetti, Aderson, Cris e Ian. Aos técnicos de enfermagem: Sandra, Mirtes e Márcia. Aos auxiliares de administração: Nayara, Jaqueline, Mari e Sir.

À Universidade Regional de Blumenau (FURB), pela utilização dos laboratórios de apoio.

À Professora Tatiani Botelho, Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FURB, pelo auxílio e boa vontade, na utilização dos laboratórios da instituição, inclusive em horários alternativos.

Aos colegas de FURB, especialmente à Daniela L. Hoeltgebaum; este trabalho não teria acontecido sem a sua ajuda. À Larissa dos Santos, que, além de colega, foi grande amiga em todos os momentos, sendo grande companhia nos cafés e no laboratório.

Aos meus amigos e colegas do programa, especialmente ao André Beringhs e Milene Dalmina, que estiveram presentes em todas as etapas.

Aos colegas do Laboratório MIMA, Daniela, Ariella, Elizandra, Joesa, Clarice, Caetana, Rebecca, Paulo, Cristina, Juliana, Suellen.

Aos meus amigos fora da academia, Anderson, Maisa, Shin, Fran, Morgui, Carol, pela paciência e compreensão com a minha ausência.

A todos os meus familiares, amigos e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

“De alguma forma, eu não posso acreditar que existam alturas que não podem ser escaladas por um homem que conhece os segredos de fazer sonhos se tornarem realidade. [...] Quando você acredita em uma coisa, acredita nela por todo caminho, implícita e inquestionavelmente”

(Walt Disney)

RESUMO

A pneumonia pode ser causada por diversos microrganismos e classificada de forma abrangente, havendo poucos e frágeis estudos clínicos e epidemiológicos sobre pneumonias adquiridas na comunidade (PACs). Os patógenos mais frequentes nas PACs são *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (em pneumonias típicas) e *Mycoplasma pneumoniae* (em pneumonias atípicas). Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para detecção molecular dessas bactérias em amostras de orofaringe, avaliar sua prevalência e o perfil clínico-epidemiológico de pacientes com PAC em um hospital na cidade de Blumenau/SC. Para tanto, além da técnica de PCR padronizada *in house*, foram realizadas culturas de raspado de orofaringe e pesquisa de anticorpos específicos para detecção de *M. pneumoniae*. A reação de PCR realizada com os iniciadores desenhados neste estudo para *M. pneumoniae* apresentou sensibilidade 10x maior que a reação mais citada na literatura, e a sensibilidade das reações para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* foi 0,1ng de DNA/reação. Dos 58 pacientes incluídos no estudo, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* foram detectados respectivamente em 41,38% e 15,52% das amostras. *M. pneumoniae* não foi detectado em nenhuma amostra analisada por métodos de cultura, PCR e sorologia com anticorpos específicos IgM. Todavia não se exclui a circulação dessa bactéria na região devido à presença de anticorpos IgG específicos. A maioria dos pacientes com PAC avaliados apresentou idade ≥ 65 anos e pelo menos uma comorbidade. A maioria dos pacientes apresentou quatro ou mais sinais e sintomas, destes os mais prevalentes foram dispneia, tosse, secreção purulenta e crepitações. Evidenciou-se, neste estudo, a baixa aderência dos clínicos às Diretrizes Brasileiras para diagnóstico, estratificação e tratamento dos pacientes com suspeita de PAC, pois os exames complementares para diagnóstico e avaliação de risco dos casos e o antibiótico escolhido para grande parte dos pacientes não estava de acordo com a determinação das diretrizes. Sugere-se a replicação desta pesquisa, pois os resultados foram de encontro àqueles apresentados na literatura relacionada ao entendimento de PAC, acompanhamento dos ciclos epidêmicos de *M. pneumoniae* na região e conhecimento da real prevalência dos patógenos típicos, uma vez que o *H. influenzae* foi o patógeno mais detectado.

Palavras-chave: Pneumonia adquirida na comunidade (PAC); *M. pneumoniae*; PCR; Métodos moleculares; *H. influenzae*; *S. pneumoniae*.

ABSTRACT

Bacterial Pneumonia Acquired in the Community: Clinical-epidemiological evaluation and standardization methods for molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*.

Pneumonia can be caused by different microorganisms and classified through comprehensive forms, but there are few and fragile clinical and epidemiological studies of community-acquired pneumonia (CAPs). The most common pathogens in CAPs are *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* (in typical pneumonia) and *Mycoplasma pneumoniae* (in atypical pneumonia). Therefore, the aim of this study was to standardize a methodology for molecular detection of these bacteria in the oropharynx samples, and to evaluate their prevalence and the clinical and epidemiological profile of patients with CAP in a hospital in Blumenau/SC. Thus, besides the standard technique PCR in-house, oropharyngeal swab cultures and search for specific antibodies for detection of *M. pneumoniae* were performed. The PCR reaction performed with primers designed in this study for *M. pneumoniae* showed sensitivity greater than 10-fold the most cited in the literature reaction and the sensitivity of the reactions to *S. pneumoniae* and *H. influenzae* was 0.1 ng DNA / reaction. Out of the 58 patients included in the study, *H. influenzae* and *S. pneumoniae* were detected respectively in 41.38% and 15.52% of the samples. *M. pneumoniae* was not detected in any sample analyzed by culture methods, PCR and serology with IgM specific antibodies. Nevertheless it is not possible to exclude the circulation of this bacterium in the region due to the presence of specific IgG antibodies. Most CAP patients evaluated were 65 years or older and had at least one comorbidity. Most of the patients had four or more signs and symptoms, the most prevalent ones were dyspnea, cough, purulent secretion and crackles. It is evident in this study the low adherence of the practitioners to Brazilian Guidelines for the diagnosis, stratification and treatment of patients with suspected CAP, as the laboratory tests for diagnosis and case risk assessment and also the antibiotic selected for most patients were not determined according to the guidelines. Replication of this research is indicated for a better understanding of the CAP, support of epidemic cycles of *M. pneumoniae* in the region and knowledge of the real prevalence of the typical pathogens.

Keywords: Community-acquired pneumonia (CAP). *M. pneumoniae*. PCR. Molecular methods. *H. influenzae*. *S. pneumoniae*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Agentes mais isolados em pneumonias adquiridas na comunidade (PACs), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).	30
Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo e tamanho do produto.....	62
Quadro 3 – Microrganismos isolados nos pacientes deste estudo com PAC, de acordo com o exame solicitado.....	84
Quadro 4 – Características dos iniciadores utilizados para a detecção de <i>M. pneumoniae</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação geral de pneumonia aguda.	28
Figura 2 – Colônias características de <i>M. pneumoniae</i> , em meio Agar SP4, aumento de 95x.	32
Figura 3 – Critérios para o Diagnóstico de pneumonia bacteriana relacionada à saúde em pacientes sem ventilação mecânica.	39
Figura 5 – Esquema de tratamento de pacientes diagnosticados com PAC, de acordo com o nível de gravidade.	46
Figura 6 – Esquema representativo para cultura de <i>M. pneumoniae</i> a partir de amostras de raspado de orofaringe em meio de transporte.	53
Figura 7 – Figura representativa de uma cultura negativa e positiva para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> em meio Hayflick bifásico modificado.	54
Figura 8 – Esquema representativo das diluições realizadas para a titulação de <i>M. pneumoniae</i> cepa M129.	60
Figura 9 - Distribuição dos doentes incluídos no estudo com diagnóstico de PAC, estratificada por sexo e idade.	65
Figura 10 – Número de internações por pneumonia em Blumenau-SC, classificadas de acordo com o ano.	67
Figura 12 – Regiões conservadas do gene da proteína de citoadesina P1 de <i>M. pneumoniae</i> avaliadas para o desenho de iniciadores específicos.	88
Figura 14 – Titulação da cultura positiva de <i>M. pneumoniae</i> M129.	94
Figura 15 - Gel de agarose representativo do teste da sensibilidade dos iniciadores descritos anteriormente e desenhados neste estudo.	95
Figura 16 – Esquema representativo da quantidade CCU na amostra PS+.	96
Figura 17 - Gel representativo da PCR para o teste de especificidade para os iniciadores desenhados neste estudo.	97
Figura 18 - Gel representativo do limite de detecção para <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i>	98
Figura 19 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de <i>M. pneumoniae</i> em pacientes com PAC deste estudo, utilizando os iniciadores descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993).	100
Figura 20 - Foto representativa da reação de PCR para detecção de <i>M. pneumoniae</i> em pacientes com PAC, utilizando os iniciadores desenhados neste estudo.	100
Figura 21 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de <i>H. influenzae</i> em pacientes com PAC deste estudo.	103
Figura 22 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de <i>S. pneumoniae</i> em pacientes com PAC deste estudo.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de reagentes para a reação de PCR de <i>M. pneumoniae</i> , com iniciadores descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993).	57
Tabela 2 – Padronização da PCR para <i>M. pneumoniae</i> com iniciadores desenhados neste estudo.	58
Tabela 3 – Concentrações de reagentes utilizados para PCR com os iniciadores para <i>H. influenzae</i> e <i>S. pneumoniae</i>	61
Tabela 4 – Características dos pacientes diagnosticados com PAC no presente estudo.	69
Tabela 5 – Características dos pacientes de acordo com o sexo neste trabalho.	72
Tabela 6 – Prevalência dos sinais e sintomas em pacientes com PAC no presente estudo, de acordo com a idade.	74
Tabela 7 – Características dos pacientes internados e tratados ambulatoriamente analisados neste estudo.	77
Tabela 8 - Características dos pacientes que vieram a óbito e pacientes que sobreviveram no presente estudo.	79
Tabela 9 – Concentração de DNA e relação A_{260}/A_{280} de amostras de paciente saudável em relação à metodologia empregada.	87
Tabela 10 – Concentrações de reagentes utilizados para PCR de <i>M. pneumoniae</i> com os iniciadores desenhados neste estudo.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[]	Concentração
ΔG	Energia Livre de Gibbs
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
μL	Microlitros
μm	Micrometro
μM	Micromolar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CCU/mL	Unidades de mudança de cor por mililitros
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
Cel/mm^3	Células por milímetro cúbico
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CURB-65	Confusão mental, Ureia, Frequência respiratória, Pressão e Idade
DM	Diabetes melito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfatado
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRC	Doença Renal Crônica
dT_m	Diferença de temperatura de fusão
g	Força g
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
ITR	Infecções do Trato Respiratório
ITRI	Infecções do Trato Respiratório Inferior
ITRS	Infecções do Trato Respiratório Superior
Kcal/mol	Quilocaloriais por mol
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LBA	Lavado Broncoalveolar
M	Molar
<i>M. fermentans</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. orale</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

<i>M. salivarium</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
mg/dL	Miligramas por decilitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
ng/μL	Nanogramas por microlitro
nm	Nanometros
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSI	<i>Pneumonia Severity Index</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T_m	Temperatura de fusão
TR	Trato Respiratório
U	Unidades
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitros
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE (PAC)	27
2.1.1 Agentes etiológicos.....	29
2.1.2 Diagnóstico das PACs	36
2.1.3 Avaliação de risco da PAC	43
2.1.4 Tratamento	45
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 METODOLOGIA	51
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	51
4.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	51
4.2.1 Hospital	51
4.2.2 Cálculo da amostragem	51
4.2.3 Amostras clínicas.....	52
4.2.4 Critérios de inclusão.....	52
4.3 TESTES SOROLÓGICOS PARA <i>M. pneumoniae</i>	53
4.4 CULTURA PARA <i>M. pneumoniae</i>	53
4.5 MÉTODOS MOLECULARES	54
4.5.1 Extração e purificação do DNA	54
4.5.2 PCR.....	56
4.6 DEFINIÇÃO DA ETIOLOGIA	62
4.7 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA AO CONSENSO BRASILEIRO SOBRE PNEUMONIAS.....	63
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE PNEUMONIA AVALIADOS.....	65
5.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	85
5.3 PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE <i>M. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> E <i>H. influenzae</i>	85

5.3.1	Extração e purificação do DNA	86
5.3.2	Desenho e avaliação de iniciadores para detecção de <i>M. pneumoniae</i>	88
5.3.3	Padronização da PCR para os iniciadores desenhados neste estudo	92
5.3.4	Teste de sensibilidade dos iniciadores para <i>M. pneumoniae</i> .	94
5.3.5	Teste de especificidade in vitro dos iniciadores desenhados...	96
5.3.6	Limite de detecção de <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i>	97
5.4	AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS BACTERIANOS NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM PAC.....	99
5.4.1	Prevalência de <i>M. pneumoniae</i>	99
5.4.2	Prevalência de <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i> por métodos moleculares	102
6	CONCLUSÕES.....	105
7	Perspectivas	107
8	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEPSH).....	123
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	127

1 INTRODUÇÃO

A pneumonia se caracteriza pela infecção do espaço alveolar por um microrganismo, como fungos, bactérias e vírus (CORRÊA et al., 2009; FEIN et al., 2006). Pode ser classificada clinicamente de acordo com o local de aquisição, como pneumonia hospitalar, adquirida na comunidade e em casas de repouso (CUNHA, 2009). A pneumonia adquirida na comunidade (PAC) consiste naquela adquirida fora do ambiente hospitalar, ou nas primeiras 48 horas após admissão hospitalar (BRASIL, 2010; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007). As manifestações clínicas mais prevalentes são dispneia, tosse, produção de secreção purulenta, principalmente se acompanhadas de febre e sons alterados na ausculta pulmonar (DA CUNHA et al., 2002; WATKINS; LEMONOVICH, 2014). Em pacientes idosos, sintomas clássicos podem estar ausentes e a confusão mental pode estar associada (LIM et al., 2009).

Os principais patógenos isolados em pacientes com PAC, em todo o mundo, são *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, considerados patógenos típicos (LIU; DASARAJU; LIU, 1996). *S. pneumoniae* é o patógeno mais comum entre idosos, crianças e pacientes que requerem internação (MANDELL, 2004). *H. influenzae* é o segundo patógeno mais isolado nas PAC (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007), acometendo principalmente idosos com histórico de tumores e com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (CARDOSO et al., 1998).

Dentre os patógenos atípicos, destaca-se o *Mycoplasma pneumoniae*, sendo o patógeno mais isolado em pacientes com PAC tratados ambulatoriamente (CAO; QU, 2014). *M. pneumoniae* pode ocasionar desde infecções assintomáticas até pneumonias severas (WAITES; TALKINGTON, 2004). Caracteriza-se pela ausência de parede celular, não se corando pelo método de Gram e apresentando resistência natural aos antibióticos betalactâmicos (BÉBÉAR, 2007). Por apresentar vias biossintéticas limitadas, não cresce em meios usualmente utilizados para cultura (VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007). A incidência de *M. pneumoniae* varia de acordo com o ano de estudo, devido a epidemias cíclicas que ocorrem a cada 3 – 7 anos (BANTAR et al., 2010).

A primeira Diretriz Brasileira para PAC em adultos competentes foi criada em 2004 e atualizada em 2009. O objetivo principal do documento é contribuir para melhorar a assistência ao paciente adulto

imunocompetente portador de PAC. As diretrizes propõem uma aplicação racional na prática médica, preconizando o diagnóstico radiológico de tórax para a confirmação de PAC. Além disso, sugerem esquema de tratamento, pedido de exames e avaliação da gravidade, como instrumentos para auxiliar a tomada de decisões (CORRÊA et al., 2009).

A PAC é uma das principais doenças infecciosas responsáveis por internações no Brasil (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010), todavia são escassos os estudos que avaliem a incidência da doença, os principais patógenos, perfil clínico, bem como a gravidade das PAC (DONALISIO et al., 2011). As infecções do trato respiratório são, provavelmente, uma das situações que, com frequência, levam à prescrição abusiva de antimicrobianos, e o conhecimento dos principais patógenos auxilia na decisão do tratamento inicial adequado (BANTAR et al., 2010). Sabendo que a incidência dos patógenos varia de país para país e das escassas informações epidemiológicas no Brasil, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos clínico-epidemiológicos para a melhor compreensão das PACs na nossa região (aqui entendida como a região de Blumenau/SC).

Considerando a importância das pneumonias comunitárias dentre as doenças infecciosas graves nas populações humanas, algumas questões básicas motivaram o presente estudo: Quais são de fato os antibióticos prescritos como primeira escolha pelos clínicos no tratamento empírico das PACs: os macrolídeos ou os betalactâmicos? Qual a importância de *M. pneumoniae* na etiologia das PACs em nossa realidade? Seria interessante, ao contrário do que preconizam as Diretrizes Nacionais, investir no diagnóstico etiológico das PACs por bactérias típicas ou atípicas para dirigir a antibioticoterapia mais adequadamente? Os clínicos vêm seguindo os critérios recomendados para diagnóstico e tratamento das PACs em nossa realidade? Acreditamos que as respostas a essas perguntas podem trazer contribuições importantes para o manejo dessas infecções em nossa realidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE (PAC)

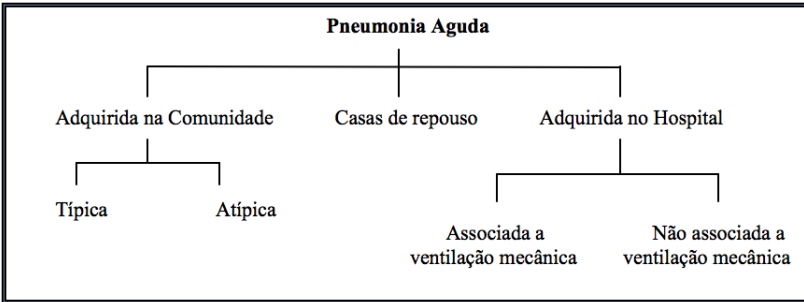
A definição de pneumonia é infecção do espaço alveolar, com o acúmulo de secreções e células inflamatórias no alvéolo, células vermelhas e fibrina, em resposta à proliferação de um microrganismo (DUNITZ, 1996; FEIN et al., 2006), como fungos, bactérias ou vírus (CORRÊA et al., 2009; LIU; DASARAJU; LIU, 1996). O resultado desse processo é a dificuldade de trocas gasosas e o aumento do peso dos pulmões (CUNHA, 2009; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

Obter informações sobre a incidência de pneumonia no mundo tem-se mostrado difícil (SPEIZER et al., 2006). Todavia, ela é considerada a terceira maior causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, devido à dificuldade de estabelecer o agente etiológico e dirigir a terapêutica específica, além da grande diversidade de agentes possíveis (BRASIL, 2010).

As pneumonias podem ser classificadas de forma abrangente como pneumonias hospitalares, pneumonias adquiridas na comunidade (PAC), pneumonias em imunocomprometidos (WATKINS; LEMONOVICH, 2014) e pneumonias em casas de repouso. Toda pneumonia adquirida fora do ambiente hospital ou até 48 horas após a admissão nesse ambiente é considerada PAC; já as pneumonias adquiridas durante o tempo permanecido no hospital (em um período maior ou igual a 48 horas após admissão) ou durante o período de uma semana após alta são consideradas como pneumonia nosocomial. A Figura 1 apresenta a classificação geral das pneumonias como: hospitalares, associadas ou não à ventilação mecânica; PACs, classificadas como típicas e atípicas de acordo com o agente etiológico e pneumonias em casas de repouso (CUNHA, 2009).

As diferentes classificações de pneumonia implicam o direcionamento do diagnóstico etiológico, terapia e prognóstico. Ainda, as pneumonias podem ser classificadas pela gravidade da doença, local de tratamento, patógeno e pelo estado imunológico do paciente (CUNHA, 2009; MANDELL, 2004).

Figura 1 – Classificação geral de pneumonia aguda.



Fonte: Cunha (2009).

As PACs são consideradas o tipo mais comum de pneumonia (EBRAHIMZADEH et al., 2014) e permanecem uma grande causa de mortalidade e morbidade (BRASIL, 2010; CORRÊA et al., 2009; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007). A incidência das PACs varia de acordo com a população estudada, principalmente quando relacionadas à idade, todavia estima-se que ocorram de 5 a 12 casos por 1.000 habitantes por ano (CABRE, 2009; CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; JOKINEN et al., 1993; JOSÉ; PERISELNERIS; BROWN, 2015; MANDELL, 2004; ROYSTED et al., 2015; SCHWARTZMANN et al., 2010).

A taxa de mortalidade das PACs varia de acordo com a necessidade de internação; estima-se que seja menor que 1% nos pacientes tratados ambulatoriamente e pode chegar a 12% nos pacientes hospitalizados (BLASI et al., 2008; CASTRO et al., 2008; MANDELL, 2004). No Brasil, a PAC foi considerada a quinta maior causa de óbitos no ano de 2005, sendo que 61% dessas mortes foram em idosos acima de 70 anos (CORRÊA et al., 2009).

Em 2007, no Brasil, a PAC foi considerada a primeira causa de internações por doenças, excetuando-se as causas obstétricas. As internações variam de acordo com a faixa etária, acometendo, na maior parte, crianças (< 5 anos) e idosos (> 80 anos) (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; CORRÊA et al., 2009). Apesar da quantidade de internações por pneumonia diminuir nas últimas décadas, a taxa de mortalidade vem aumentando, justificada pelo aumento das internações de casos mais graves e o envelhecimento da população (CORRÊA et al., 2009).

O aumento da incidência e mau prognóstico de pneumonia está associado à presença de comorbidades, má nutrição, baixa condição socioeconômica e tabagismo, em pacientes com ou sem tratamento (SPEIZER et al., 2006). Alguns fatores aumentam o risco de pneumonia, como etilismo, má nutrição, tabagismo, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, bronquite crônica, infecções respiratórias virais, síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), câncer de pulmão, linfoma, doença crônica renal ou hepática (MANDELL, 2004; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004) e imunodeficiências de causas diversas (WATKINS; LEMONOVICH, 2011). Os pacientes idosos são mais acometidos, principalmente por apresentarem maiores fatores de risco e comorbidades, sendo uma das principais causas de óbitos nessa população; entretanto, os dados sobre causa e epidemiologia das PACs não são abundantes nem robustos (MANDELL, 2004).

Apesar da disponibilidade de novos medicamentos e vacinas, as PACs ainda continuam sendo uma doença grave. Além disso, existem poucos estudos caracterizando os agentes etiológicos de pneumonias, pela dificuldade de isolamento dos microrganismos e manifestações clínicas inespecíficas, levando à escolha empírica da antibioticoterapia (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

As PACs, como já dito anteriormente, podem ser classificadas em típicas e atípicas (FEIN et al., 2006). Originalmente o termo pneumonias atípicas foi aplicado nos casos de pneumonia com sintomatologia mais branda e prolongada, normalmente causada por *Mycoplasma pneumoniae*. Mais tarde, outras bactérias, como *Chlamydophila pneumoniae* e *Legionella pneumophila*, foram incluídas nesse grupo (FEIN et al., 2006; MANDELL, 2004). Os patógenos atípicos são geralmente identificados em PAC quando há o uso de metodologias específicas para o diagnóstico (ARNOLD et al., 2007; CORRÊA et al., 2009).

As pneumonias consideradas típicas se caracterizam pelas manifestações clínicas associadas com *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (FEIN et al., 2006; LIU; DASARAJU; LIU, 1996).

2.1.1 Agentes etiológicos

O agente etiológico mais frequente nas PACs varia entre continentes, países e fatores epidemiológicos (época do ano, surtos e faixa etária), dependendo da população estudada (BRASIL, 2010;

CHEN et al., 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Provavelmente isso se dá em virtude das diferenças nas estações e áreas geográficas (CHEN et al., 2013).

No mundo, o patógeno mais importante é *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma pneumoniae* (CUNHA, 2009; JANSSENS, 2005; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; JOSÉ; PERISELNERIS; BROWN, 2015; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007), *Chlamydomphila pneumoniae* e, em alguns países, patógenos Gram negativos (JOSÉ; PERISELNERIS; BROWN, 2015). Conforme o Quadro 1, *M. pneumoniae* é o patógeno atípico mais isolado em PAC no mundo (ARNOLD et al., 2007) e é encontrado normalmente entre 1-13% nos idosos (JANSSENS, 2005).

Os vírus também são patógenos importantes, sendo encontrados em até 10% das PACs, principalmente no inverno. O início da vacinação em idosos contra o vírus influenza fez com que a sua incidência reduzisse consideravelmente, diferentemente do que ocorre com a vacinação para *S. pneumoniae*, que inclui somente alguns sorotipos (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001).

Quadro 1 – Agentes mais isolados em pneumonias adquiridas na comunidade (PACs), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Agente	Prevalência (%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20 – 60
<i>Haemophilus influenzae</i>	3 - 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 – 5
Anaeróbios da cavidade oral	6 – 10
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 – 3
Outros Gram negativos	3 – 10
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	5 – 17
<i>Legionella pneumophila</i>	2 – 8
Vírus Respiratórios	2 - 15

Fonte: Brasil, (2010).

2.1.1.1 *Mycoplasma pneumoniae*

O patógeno *M. pneumoniae* foi primeiramente identificado como um vírus (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971), até que foi observada a sua resposta ao tratamento com antibióticos (WAITES; TALKINGTON,

2004). Essa bactéria está associada ao trato respiratório inferior e superior e a outros sítios como a pele, sistema nervoso central, sangue, coração e articulações (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007).

M. pneumoniae é um patógeno comum em PAC e apresenta um período de incubação que varia entre duas e três semanas. Os sinais e sintomas são geralmente inespecíficos, como dor de cabeça, mal-estar, febre, tosse, tanto em adultos como em crianças. *M. pneumoniae* pode causar desde infecções assintomáticas até pneumonias severas que requerem hospitalização (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004; WAITES; TALKINGTON, 2004).

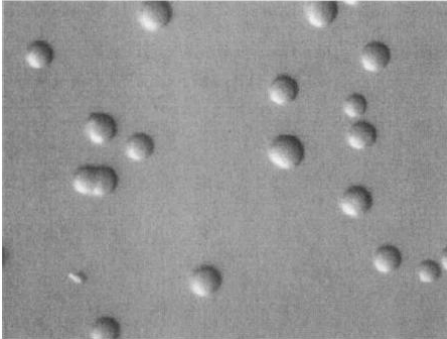
A prevalência de *M. pneumoniae* pode sofrer flutuações, dependendo da população, local do estudo (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; MACHADO et al., 1991) e métodos de diagnóstico (VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007). É endêmico no mundo e é causa de epidemias a cada 4 a 7 anos, ocasionando pequenos surtos em bases militares, famílias, escolas e universidades, ou podem ocorrer casos isolados (BÉBÉAR, 2007; LIU; DASARAJU; LIU, 1996; MANDELL, 2004; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007). É uma das maiores causas de PAC em pacientes tratados ambulatoriamente, principalmente nos jovens de 5 a 20 anos (LIU; DASARAJU; LIU, 1996; MANDELL, 2004).

Os micoplasmas são considerados os menores organismos capazes de autorreplicação (CHEN et al., 2015; MANDELL, 2004; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004), tanto em sua dimensão celular quanto em tamanho genômico (WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001). Não possuem parede celular de peptidoglicanos e sim uma membrana celular lipídica (BÉBÉAR, 2007; DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; MANDELL, 2004). Assim não podem ser classificados como a maioria das bactérias; são pleomórficas e não se coram pelo Gram. Não são bactérias de vida livre na natureza, uma vez que necessitam de nutrientes fornecidos pela célula do hospedeiro (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004).

M. pneumoniae possui uma morfologia característica de um bacilo, com 1-2 µm de comprimento e 0,1 – 0,2 µm de largura, ou seja, um volume celular de 5% dos bacilos típicos. As colônias características de *M. pneumoniae* apresentam morfologia esférica, conforme observado

na Figura 2, e dificilmente ultrapassam 100 µm, sendo observadas somente com o auxílio de um microscópio (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001).

Figura 2 – Colônias características de *M. pneumoniae*, em meio Agar SP4, aumento de 95x.



Fonte: Waites; Talkington (2004).

A transmissão da infecção ocorre por aerossóis, de pessoa para pessoa, pela tosse (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; DUMKE et al., 2015; MANDELL, 2004; WAITES; TALKINGTON, 2004). Apesar de serem extremamente sensíveis à dessecação (CHEN et al., 2015; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004), podem ser isolados da orofaringe semanas e até meses após recuperação total (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001).

M. pneumoniae possui uma rede de proteínas que fornece o citoesqueleto para a membrana celular e também produz um material capsular que está relacionado à citoadesina (BÉBÉAR, 2007; CHEN et al., 2015; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004). A sobrevivência de *M. pneumoniae* é dependente da aderência ao epitélio respiratório do hospedeiro e é considerada um dos fatores de virulência que podem ocasionar dano ao tecido do hospedeiro pela liberação de peróxido de hidrogênio, pela resposta inflamatória gerada com a deterioração dos cílios e pelo dano local causado pela citoadesina (BÉBÉAR, 2007; MANDELL, 2004; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001).

O genoma de *M. pneumoniae* foi sequenciado pela primeira vez em 1996 e consiste de 816.394 pares de base (pb) (BÉBÉAR, 2007; CHEN et al., 2015; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007) e 687 genes, possuindo apenas um sexto do tamanho de *Escherichia coli*. Por apresentar genoma reduzido, as vias biossintéticas são limitadas e requerem um meio de cultura (*in vitro*) extremamente enriquecido (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004).

M. pneumoniae não cresce em meios de culturas utilizados frequentemente para outras bactérias, não se cora pelo método de Gram (frequentemente realizado em amostras de escarro para diagnóstico de pneumonia) e as colônias somente são observadas com o auxílio de um microscópio (VERVLOET et al., 2010; WAITES; TALKINGTON, 2004). Essas características fazem com que o diagnóstico de *M. pneumoniae* seja considerado desafiador, além dos sintomas serem inespecíficos e a suspeita de infecção normalmente ocorrer após a ausência de resposta ao tratamento com betalactâmicos (BÉBÉAR, 2007; DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004), comumente administrados nos casos de pneumonia (VERVLOET et al., 2010).

M. pneumoniae não faz parte da flora normal do trato respiratório e, quando isolado/detectado, é considerado indicativo de infecção (BÉBÉAR, 2007; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007). O diagnóstico pode ser feito por metodologias específicas como cultura, amplificação gênica e testes sorológicos (BÉBÉAR, 2007; VERVLOET et al., 2010; WAITES; TALKINGTON, 2004).

As amostras que podem ser utilizadas tanto para cultura quanto para Reação em cadeia da polimerase (PCR) são: raspado de orofaringe e nasofaringe e amostras provenientes do trato respiratório inferior (líquido pleural, fluido de lavagem broncoalveolar, aspirado endotraqueal, tecido pulmonar) (WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001).

O patógeno *M. pneumoniae* é uma bactéria anaeróbia facultativa e de crescimento lento, levando de uma a quatro semanas para ser detectado em cultivo. Além da demora do crescimento, a sensibilidade desse método é baixa (BÉBÉAR, 2007; MACHADO et al., 1991; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007), todavia, quando há crescimento, esse teste é 100% específico (WAITES; TALKINGTON, 2004). Os micoplasmas possuem esteróis, na sua tripla membrana celular, para fornecer suporte osmótico. Os esteróis são fornecidos em meios de cultura, pela adição de soro, normalmente soro fetal bovino

(BÉBÉAR, 2007; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004). Os meios de cultura mais utilizados são o SP4 e o Hayflick glicose modificado, tanto ágar quanto caldo. Os meios bifásicos, uma parte ágar e outra parte caldo, têm apresentado êxito no cultivo de *M. pneumoniae* (SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004). *M. pneumoniae*, por apresentar dimensão celular reduzida, não turva o meio de cultura, porém fermenta a glicose, sendo o ácido produzido detectado pelo indicador de pH (vermelho de fenol) presente no meio de cultura (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004; WAITES et al., 2001).

O diagnóstico por métodos moleculares, como PCR, é considerado mais específico e pode duplicar a taxa de detecção se comparado com os testes sorológicos e de cultura (BÉBÉAR, 2007; LIM et al., 2009; WARING et al., 2001). Partes conservadas do gene da proteína de adesão P1 normalmente são o alvo de escolha para os iniciadores da amplificação do seu ácido desoxirribonucleico (DNA) (WAITES; TALKINGTON, 2004).

A sorologia ainda é considerada padrão ouro para o diagnóstico de *M. pneumoniae* (SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004); entretanto, poucos kits comerciais disponíveis apresentam boa sensibilidade e especificidade (LIM et al., 2009). O método de imunoenensaio enzimático (ELISA) é preparado a partir de vários antígenos como glicoproteínas, proteínas e peptídeos sintéticos (incluindo a proteína de adesão P1) e uma mistura de antígenos. Esses testes permitem a detecção de anticorpos IgG e IgM específicos (VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007). A sorologia apresenta algumas vantagens, tais como, fácil coleta de amostra e armazenamento, contudo há necessidade de coleta na fase aguda e na fase convalescente (WAITES; TALKINGTON, 2004).

A administração dos antimicrobianos em infecções respiratórias por *M. pneumoniae* geralmente apresenta resultados satisfatórios e reduz consideravelmente os sintomas respiratórios. Devido à ausência de parede celular, a utilização de antibióticos betalactâmicos não é eficaz, apesar de ser um dos medicamentos de escolha para ITRI. Os antibióticos que apresentam atividade contra *M. pneumoniae* são os da classe dos macrolídeos, considerados antibióticos de primeira escolha, das tetraciclínas e das fluoroquinolonas (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES; TALKINGTON, 2004).

2.1.1.2 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae é o patógeno mais importante do gênero *Haemophilus*. A presença ou ausência de antígenos capsulares permite a classificação dos isolados em cepas tipáveis e não tipáveis (MUSHER, 1996). É um dos patógenos mais frequentes nas PACs e tem chamado a atenção dentre os patógenos respiratórios, acometendo frequentemente pacientes idosos com histórico de tumores e DPOC (CARDOSO et al., 1998; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001), especialmente por cepas não capsuladas (CAMPOS et al., 2004; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

H. influenzae tipo B era considerada a principal bactéria causadora de pneumonia em crianças antes da vacina específica. No entanto, ainda hoje, *H. influenzae* não tipável é a principal causa de pneumonia em adultos (MANDELL, 2004; MUSHER, 1996).

A bactéria é um cocobacilo Gram negativo, não esporulado e que frequentemente coloniza o trato respiratório de indivíduos com fatores predisponentes, como DPOC (CARDOSO et al., 1998; MANDELL, 2004). *H. influenzae* é considerada uma bactéria de difícil crescimento e requer os fatores X e V para o cultivo (MUSHER, 1996). Os humanos são os únicos hospedeiros e a transmissão normalmente ocorre por aerossóis ou contato direto (MANDELL, 2004).

O diagnóstico da infecção por *H. influenzae* por cultura de escarro é muitas vezes superestimado, pois esse é um patógeno que pode fazer parte da biota normal da orofaringe (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007). As secreções respiratórias devem ser inoculadas para a cultura em meio ágar chocolate e, em secreções purulentas, o diagnóstico pode ser feito pelo método de Gram, observando-se cocobacilos pleomórficos Gram negativos (MUSHER, 1996; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001) frequentemente localizados dentro do citoplasma de leucócitos, o que sugere fortemente pneumonia por *H. influenzae* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001).

2.1.1.3 *Streptococcus pneumoniae*

O patógeno *S. pneumoniae* é a maior causa de ITRI, sinusites, meningites e septicemias (CORRÊA et al., 2009; PATTERSON, 1996; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004). Esse patógeno acomete

normalmente idosos e crianças, mas apresenta alta prevalência em adultos com doenças broncopulmonares, imunodeficientes (PATTERSON, 1996; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004) ou com comorbidades cardiovasculares (FILE JR., 2003; LIM et al., 2009).

É considerado o principal patógeno dentre as PACs que requerem hospitalização, sendo encontrado em 9 a 55% desses pacientes. Todavia, em pacientes tratados ambulatoriamente, não foi considerado o patógeno mais comum (5 a 9% dos casos) (MANDELL, 2004).

As pneumonias causadas por *S. pneumoniae* normalmente ocorrem no inverno, são abruptas, com febre elevada ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) (LIM et al., 2009) e calafrios, seguidos de tosse produtiva e dispneia com ou sem dor torácica (CUNHA, 2009; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001).

O diagnóstico presuntivo pode ser feito pela coloração de Gram, sendo observados diplocos Gram positivos lanceolados, circundados por uma cápsula (zona clara em torno do diplococo). Em aproximadamente 12% dos casos pode ocorrer bacteremia e, em aproximadamente 50% dos pacientes, a hemocultura é positiva. O diagnóstico pode ser feito pela presença de antígeno pneumocócico urinário, que requer apenas cinco dias de infecção para apresentar resultado positivo, e/ou pelo isolamento do microrganismo do sangue, líquido pleural ou aspirado traqueal (CUNHA, 2009; FEIN et al., 2006; LIM et al., 2009; PATTERSON, 1996). *S. pneumoniae* requer meio enriquecido para o crescimento, como o Ágar Sangue. As colônias se apresentam umbilicadas e alfa hemolíticas (PATTERSON, 1996).

2.1.2 Diagnóstico das PACs

2.1.2.1 Diagnóstico clínico e radiológico

O diagnóstico correto de PAC é fundamental para otimizar o tratamento e evitar o uso desnecessário de antimicrobianos (FILE JR., 2003; SIGNORI et al., 2008). O diagnóstico de pneumonia é feito com base nos sinais, sintomas clínicos e achados radiológicos que, apesar de serem sensíveis, não são específicos devido à sobreposição de sinais e sintomas com outras doenças (CHANDRA et al., 2010; FEIN et al., 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001). Geralmente estão presentes tosse, febre e dificuldade de respirar (dispneia), taquipneia e infiltrado pulmonar, o qual deve ser confirmado com uma radiografia de tórax, além de ronc

ou crepitações na ausculta pulmonar (BANTAR et al., 2010; PARTOUCHE et al., 2015; WATKINS; LEMONOVICH, 2014).

Entretanto, o diagnóstico preciso pode ser difícil, uma vez que os sinais e sintomas clínicos não são evidentes, principalmente em idosos, nos quais a febre e a tosse podem estar ausentes em 15 a 40% dos pacientes (FEIN et al., 2006). Além disso, em diagnósticos iniciais, o infiltrado pulmonar também pode estar ausente (HAGAMAN et al., 2009; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; WATKINS; LEMONOVICH, 2014). Em alguns casos, a pneumonia pode se apresentar como exacerbação de uma doença previamente estável, como o DPOC e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) (CORRÊA et al., 2009; SCHWARTZMANN et al., 2010). Em estudo realizado por CHANDRA e colaboradores (2010), de 800 pacientes admitidos no pronto-atendimento por PAC e que foram internados, 27,3% receberam alta com diagnóstico de outras doenças.

A radiografia torácica é considerada padrão ouro para o diagnóstico de pneumonia, pois o padrão difere das outras Infecções do Trato Respiratório (ITR) (CARDOSO et al., 1998; EBRAHIMZADEH et al., 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001), e, além disso, auxilia na avaliação da gravidade, detecção de complicações e monitorização do tratamento; entretanto não evidencia a etiologia infecciosa (bacteriana ou não) (CORRÊA et al., 2009; FEIN et al., 2006; LIM et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). A radiografia também pode sugerir etiologias alternativas, como abscessos e tuberculose (CORRÊA et al., 2009).

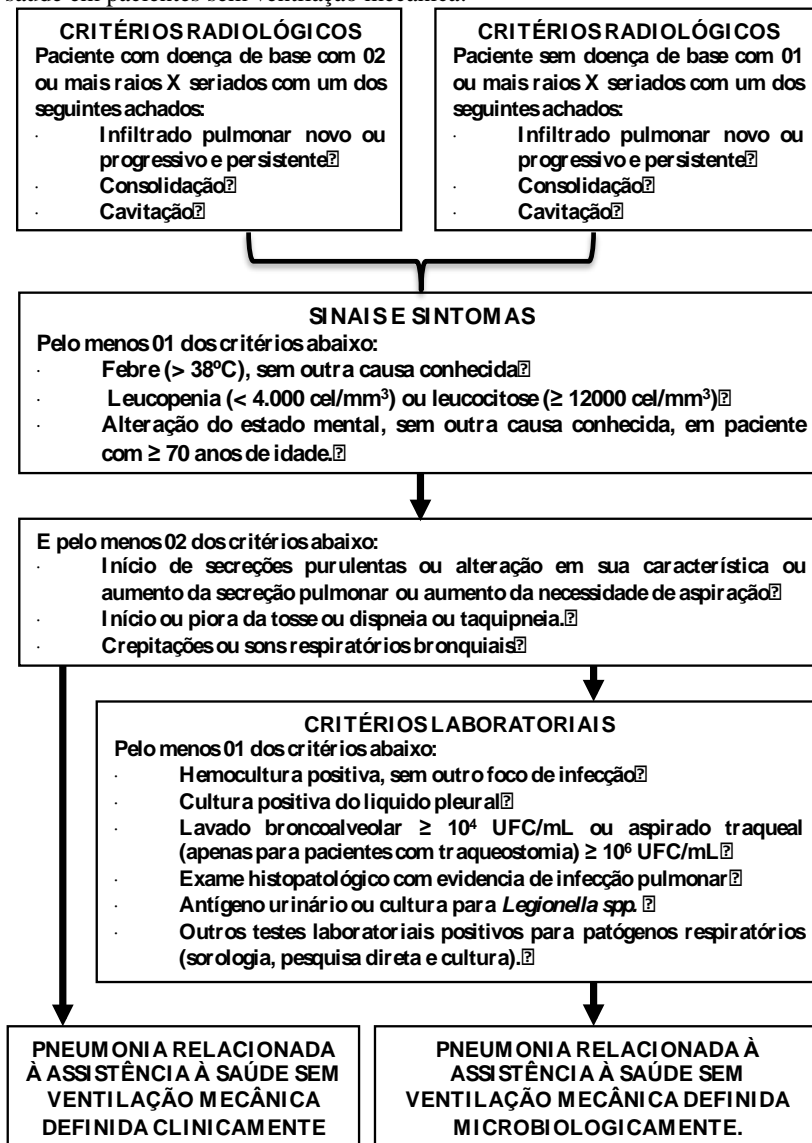
Apesar da obrigatoriedade da radiografia de tórax para o diagnóstico de pneumonia em algumas normatizações (BANTAR et al., 2010; CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004), estudos indicam que a radiografia de tórax apresenta baixa sensibilidade, quando comparada com o diagnóstico clínico, podendo apresentar-se negativa em até um terço dos casos de PAC (HAGAMAN et al., 2009). No entanto, os mesmo estudos a indicam para monitorização do tratamento (CORRÊA et al., 2009; HAGAMAN et al., 2009) e confirmação da suspeita clínica (CARDOSO et al., 1998).

Nos Estados Unidos, a presença de infiltrado recente ou progressivo é necessária para o diagnóstico de pneumonia, e os demais sintomas apresentam menos importância. A Sociedade Respiratória Europeia define pneumonia ou infecção do trato respiratório inferior

pelas apresentações clínicas, uma vez que pacientes ambulatoriais não têm acesso a radiografias (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

No Brasil, uma equipe multiprofissional, formada por vários especialistas, foi responsável pela elaboração dos “Critérios Nacionais de Infecção do Trato Respiratório” (ANVISA, 2009), apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Critérios para o Diagnóstico de pneumonia bacteriana relacionada à saúde em pacientes sem ventilação mecânica.



Fonte: ANVISA, (2009).

2.1.2.2 Diagnóstico laboratorial

Segundo certos autores, os métodos de diagnóstico, além de serem demorados e imprecisos, apresentam baixo custo-benefício e não permitem resultados imediatos (FILE JR., 2003), além de não serem indicados rotineiramente (LIM et al., 2009). A escolha da amostra é o primeiro aspecto a ser considerado, pois frequentemente as amostras apresentam contaminação com a microbiota normal da orofaringe, dificultando a identificação por microscopia ou cultura (BRASIL, 2010; RODRIGUES; SILVA FILHO; BUSH, 2002; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

Como o tratamento empírico apresenta eficácia elevada e baixa mortalidade (<1%) nos casos de PAC, a investigação etiológica normalmente é considerada desnecessária. Porém, nos casos de PAC moderadas a graves e nos casos de falha terapêutica, a identificação etiológica e o tratamento direcionado estão associados a menores taxas de mortalidade (CORRÊA et al., 2009; LIM et al., 2009; WATKINS; LEMONOVICH, 2011).

O diagnóstico etiológico é difícil, pois os sinais, sintomas clínicos e perfil radiológico não diferem de um agente causador para outro (FILE JR., 2003; WATKINS; LEMONOVICH, 2014) e, em cerca de 30 a 60% das PACs, não é identificado nenhum agente etiológico, mesmo nos estudos mais criteriosos (BRASIL, 2010; CABRE, 2009; CARDOSO et al., 1998; ROSÓN et al., 2001; VAN DER EERDEN et al., 2005).

O diagnóstico de PAC pode ser realizado a partir de várias amostras obtidas dos pacientes, dentre elas, pode-se citar o escarro, o lavado e o escovado broncoalveolar, o aspirado traqueal e a punção transpulmonar (CORRÊA et al., 2009; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004), além de urina e sangue (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Os métodos de diagnóstico podem ser microbiológicos, sorológicos, moleculares e pesquisa de antígenos urinários (CORRÊA et al., 2009; RODRIGUES; SILVA FILHO; BUSH, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

A cultura de escarro e sangue, métodos rotineiros, apresentam baixo rendimento, principalmente pela demora dos resultados e por normalmente serem realizados após a administração de antimicrobianos, o que faz com que a sensibilidade seja reduzida (BASNAYAKE;

WATERER, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Porém, a detecção do agente etiológico fornece melhores informações sobre resistência e epidemiologia, auxiliando o desenvolvimento de guias para o tratamento empírico (JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; MANDELL et al., 2007).

O diagnóstico de ITRI pelo método de cultura apresenta especificidade muito variável, pois as amostras mais invasivas, como o lavado broncoalveolar ou escovado brônquico, apresentam especificidade entre 45 a 100% (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007). Essas amostras não são rotineiras para o diagnóstico de PAC, o que faz com que as amostras de escarro sejam frequentemente utilizadas, apesar da prática ser controversa (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; CORRÊA et al., 2009; SIGNORI et al., 2008).

A cultura de amostras de escarro em pacientes ambulatoriais não é recomendada e, quando feita, deve ser coletada antes do início do tratamento com antimicrobianos (LIM et al., 2009; WATKINS; LEMONOVICH, 2011). Alguns problemas em relação a essas amostras são: a interpretação depende da prática do observador, nem todos os pacientes expectoram, a coleta deve obedecer a procedimentos adequados, e patógenos atípicos não são observados no diagnóstico de rotina (CORRÊA et al., 2009). A contaminação com flora normal do trato respiratório superior é frequente e supera o crescimento do patógeno, acarretando resultados falsamente positivos ou negativos (FEIN et al., 2006).

O método de Gram é indicado somente quando a amostra possui qualidade adequada, o que deve ser observado desde a obtenção e transporte até o processamento (LIM et al., 2009; MANDELL et al., 2007). Todavia, as análises realizadas com base nesse método fornecem informações escassas e ausência de informações relevantes, tais como, sensibilidade aos antimicrobianos (BASNAYAKE; WATERER, 2015). Ainda, apresentam apenas uma resposta presuntiva do agente etiológico, especialmente para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, o que acarreta a necessidade de outras técnicas para a confirmação (JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014). A amostra é considerada de qualidade quando são observadas menos de 10 células por campo e mais de 25 polimorfonucleares (leucócitos) por campo em aumento de 400x (CORRÊA et al., 2009; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

A hemocultura é designada somente àqueles pacientes com PAC grave, não responsivos ao tratamento (CHAUVET; COSTA; FARIA,

2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Os resultados falsamente positivos são comuns e o método apresenta baixa sensibilidade, principalmente quando a amostra é coletada após o uso de antimicrobianos (CORRÊA et al., 2009).

O diagnóstico sorológico não é recomendado rotineiramente, devido ao baixo custo-benefício e baixa importância clínica, detectando apenas infecção pregressa (JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; VAN DER EERDEN et al., 2005). Normalmente é utilizado quando há vários casos semelhantes que surgem na comunidade, em patógenos de difícil cultura (*Mycoplasma*, *Chlamydothyla*, *Legionella* e vírus) e em pacientes com PAC grave ou não responsivos ao tratamento empírico (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Apesar de não serem úteis na avaliação inicial da PAC, fornecem dados em estudos de vigilância epidemiológica (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; RODRIGUES; SILVA FILHO; BUSH, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001).

O método de antígenos urinários é simples, rápido e não influenciável pelo uso prévio de antibióticos. Pode ser utilizado para *L. pneumophila* e *S. pneumoniae* (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004), apresentando, respectivamente, sensibilidade entre 70-80% e 50-80% e especificidade próxima a 100% e 90% (CORRÊA et al., 2009).

O diagnóstico por métodos moleculares como a PCR apresenta boa sensibilidade, entre 58 e 100% e especificidade, entre 42 e 100%, dependendo do tipo de amostra; principalmente para bactérias de crescimento difícil como *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* e vírus (CORRÊA et al., 2009; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; STRÅLIN et al., 2006). Além disso o diagnóstico não é influenciado pela utilização prévia de antimicrobianos (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; HOLTER et al., 2015). Apesar de suas vantagens, os métodos moleculares ainda não são realidade para os laboratórios de rotina, além de não diferenciarem bactérias viáveis de não viáveis, no entanto podem ser uma ferramenta útil para o diagnóstico rápido (CORRÊA et al., 2009; FILE JR., 2003; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; KOBAYASHI et al., 2009).

A despeito de todas as dificuldades no diagnóstico de PAC, nas últimas duas décadas, esforços têm sido realizados para desenvolver novas ferramentas diagnósticas, resultando em melhoria no

conhecimento da resposta imunológica do hospedeiro e patogênese da doença e facilitando o estabelecimento de tratamentos profiláticos e intervenções terapêuticas (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

2.1.3 Avaliação de risco da PAC

A avaliação da severidade das PACs é a primeira e a mais importante decisão para o seu gerenciamento, principalmente para a escolha do local do tratamento, o qual pode ser hospitalar ou ambulatorial. Essa avaliação auxilia ainda a caracterização da necessidade de admissão em UTI (LIM et al., 2003; WESEMANN et al., 2015). A decisão de internar o paciente depende de muitas variáveis, incluindo gravidade da doença, doenças de base e fatores prognósticos (BANTAR et al., 2010). A avaliação da necessidade de internação é importante principalmente para redução dos custos excessivos ao sistema de saúde em virtude de internações desnecessárias (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010). Por isso, existe o interesse crescente em identificar, de forma rotineira, fidedigna, rápida e reprodutível, o local de tratamento desses pacientes (avaliação da severidade) (OSUNA et al., 2006).

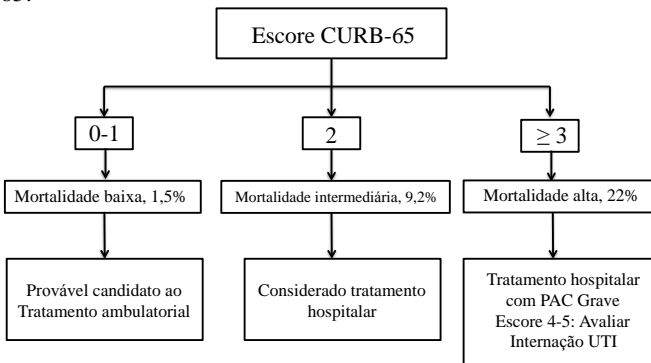
A avaliação da severidade da doença é dependente da experiência do médico, todavia esse julgamento tem superestimado a severidade. Em virtude disso, para balizar esse processo, vários índices de avaliação do risco de mortalidade e da necessidade de internação têm sido desenvolvidos (LIM et al., 2009). Esses índices ou escalas são utilizados em todo o mundo e auxiliam os médicos a tomar decisões quanto ao tratamento e avaliar possíveis prognósticos, estratificando os pacientes de acordo com o risco crescente de mortalidade (CUPURDIJA et al., 2015). Para tanto, a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, que propôs as diretrizes para estratificação das PACs, indica a utilização do *Pneumonia Severity Index* (PSI) e CURB-65 (acrônimo, em inglês, de cada fator de risco medido: confusão mental, ureia, frequência respiratória, pressão e idade) (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Ambas as escalas são dirigidas aos médicos e têm sido amplamente adotadas como instrumento clínico confiável e válido (CUPURDIJA et al., 2015), além disso, apresentam desempenho igualmente bom (BANTAR et al., 2010; LIM et al., 2009; WESEMANN et al., 2015).

O índice CURB-65, como já mencionado, baseia-se em apenas cinco variáveis: confusão mental, ureia > 50 mg/dL, frequência respiratória \geq 30 ciclos/minuto, pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou

pressão arterial diastólica ≤ 60 mmHg e idade ≥ 65 anos (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; CORRÊA et al., 2009; LIM et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Cada variável observada soma um ponto e, assim, são avaliados o risco de mortalidade de acordo com a pontuação final (pontuação 0: 0.7%, pontuação 1: 2.1%, pontuação 2: 9.2%, pontuação 3-5: 15-40% de risco de mortalidade) e a necessidade de internação, como pode ser observado na Figura 4 (LIM et al., 2009). O CURB-65 é um método mais fácil de ser adotado em emergências lotadas (ALAVI-MOGHADDAM et al., 2013; WESEMANN et al., 2015) e possui sensibilidade e especificidade de aproximadamente 80% (LIM et al., 2003, 2009).

No entanto, a escala CURB-65 caracteriza apenas as PACs como severas e não severas e não identifica pacientes com baixo risco de mortalidade, os quais talvez pudessem ser tratados ambulatoriamente ou que poderiam ser hospitalizados por apenas um curto período de tempo (LIM et al., 2003). Outra limitação desse protocolo é a não inclusão das doenças associadas que podem acrescentar maior risco, como o etilismo, insuficiência hepática e cardíaca e neoplasias. No entanto, a decisão final de internação cabe ao clínico, e esses índices apenas auxiliam na sua tomada de decisão (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Figura 4 – Estratificação dos pacientes com PAC de acordo com a escala CURB-65.



Escore de avaliação CURB-65. PAC: pneumonia adquirida na comunidade; UTI: unidade de terapia intensiva; CURB-65 (C: confusão mental; U: ureia > 50 mg/dL; R: frequência respiratória ≥ 30 ciclos/minuto; B: pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou diastólica ≤ 60 mmHg; e Idade ≥ 65 anos). Fonte: Corrêa et al. (2009).

2.1.4 Tratamento

O conhecimento dos potenciais patógenos regionais e os índices de resistência bacteriana são as informações mais importantes que se deve levar em conta para a escolha do tratamento empírico inicial (BANTAR et al., 2010; DA CUNHA et al., 2002; JATON; SCHRENZEL; GREUB, 2014; RODRIGUES; SILVA FILHO; BUSH, 2002), e que têm maior impacto no prognóstico do paciente (HOLTER et al., 2015). A avaliação da gravidade, presença de comorbidades (BANTAR et al., 2010; CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010), local de tratamento (CORRÊA et al., 2009; DA CUNHA et al., 2002), história clínica, idade, terapia prévia, histórico de pneumonia, sintomas clínicos do paciente (LIU; DASARAJU; LIU, 1996), fatores de risco, como o tabagismo e a habilidade para aderir o tratamento, deve ser igualmente realizada (WATKINS; LEMONOVICH, 2011).

A escolha do tratamento deveria ser baseada no diagnóstico preciso do agente etiológico; entretanto, como isso não é possível na maioria das vezes, o tratamento empírico é geralmente fundamentado em dados epidemiológicos sobre os agentes mais frequentes (BASNAYAKE; WATERER, 2015; BRASIL, 2010; FILE JR., 2003; LIM et al., 2009; WATKINS; LEMONOVICH, 2014). Outro ponto importante, é que o tratamento empírico deve ser rapidamente iniciado, pois existe correlação entre o início tardio do tratamento e maior taxa de mortalidade (CARDOSO et al., 1998; CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Além disso, como os sintomas clínicos não ajudam a diferenciar a PAC típica da atípica, o tratamento empírico se torna de difícil ajuste (RIQUELME et al., 1997). Também é importante o conhecimento dos antibióticos mais utilizados na região, bem como do perfil de resistência bacteriana, evitando o uso inadequado e excessivo de antimicrobianos. Em virtude disso, os manuais de escolha dos antibióticos possuem recomendações variadas de acordo com a necessidade de cada região (DA CUNHA et al., 2002; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007).

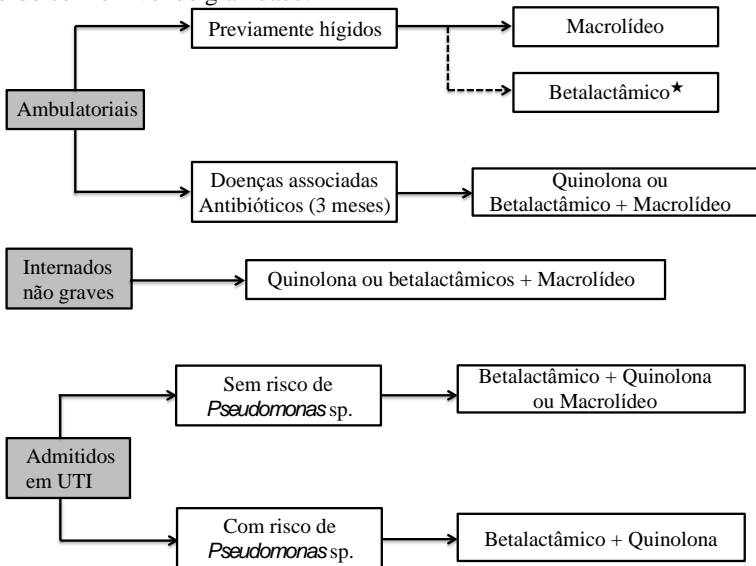
As diretrizes brasileiras e americanas preconizam a utilização de macrolídeos para pacientes ambulatoriais previamente saudáveis, pois eles apresentam espectro de ação sobre os patógenos típicos e atípicos mais comuns nessa população (*S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e *H. influenzae*). Em pacientes ambulatoriais com comorbidades que não requerem internações, o uso de macrolídeos com betalactâmicos ou o uso de fluoroquinolonas isoladamente é

recomendado. No caso de suspeita de aspiração ou infecção por anaeróbios, o uso de betalactâmicos com inibidores de betalactamases é indicado (CORRÊA et al., 2009; FILE JR., 2003; SCHWARTZMANN et al., 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Se necessário, o tratamento pode ser alterado após a identificação do microrganismo (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004; VAN DER EERDEN et al., 2005), o que é importante tanto para reduzir a pressão de seleção sobre estirpes resistentes, quanto para diminuir custos e probabilidade de efeitos adversos (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2001, 2004; VAN DER EERDEN et al., 2005).

No Brasil, o esquema de tratamento pode ser observado na Figura 5, preconizada pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (CORRÊA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Figura 5 – Esquema de tratamento de pacientes diagnosticados com PAC, de acordo com o nível de gravidade.



Antibioticoterapia empírica inicial conforme estratificação por nível de gravidade. Com o uso de betalactâmicos isolados, considerar a possibilidade de uma falha a cada 14 pacientes tratados. Fonte: Corrêa et al. (2009).

Devido a escassos estudos em relação à incidência, principais patógenos, perfil clínico e gravidade das PACs no Brasil (CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010), o presente estudo visou preencher essa lacuna na região de Blumenau/SC. Além disso, visou-se ao conhecimento dos principais antibióticos prescritos e aderência às normas brasileiras de PAC, na região, uma vez que a antibioticoterapia empírica ocorre na maior parte dos casos (SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007). Outro objetivo importante foi o conhecimento dos principais patógenos causadores de PAC, visto que as infecções do trato respiratório são responsáveis pelo uso abusivo de antibióticos, direcionando assim o tratamento. Tais informações favorecem o conhecimento das PACs na nossa realidade e auxiliam no manejo desses pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* em pacientes com suspeita clínica de pneumonia adquirida na comunidade (PAC) e avaliar o perfil clínico-epidemiológico desses pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia para detecção de *M. pneumoniae* por PCR e comparar com o protocolo mais utilizado na literatura;
- Determinar a prevalência de *M. pneumoniae* em pacientes com suspeita clínica de PAC por PCR, cultura e sorologia;
- Determinar a prevalência de *S. pneumoniae* e de *H. influenzae* em pacientes com suspeita clínica de PAC por PCR;
- Determinar o perfil clínico-epidemiológico de pacientes com PAC atendidos em um hospital de Blumenau, Santa Catarina;
- Avaliar a aderência dos clínicos, na região, às Diretrizes Brasileiras sobre pneumonias.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Regional de Blumenau em 08 de agosto de 2013, sob número 18406813.1.0000.5370 (Apêndice A).

4.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.2.1 Hospital

O Hospital, que se situa na cidade de Blumenau, Santa Catarina, é um hospital de alta complexidade, referência para o atendimento de urgência/emergência, cirurgias de alta complexidade em neurologia, cardiologia, cirurgia geral, vascular e transplantes. Conta com 260 leitos e registra uma média de 15 mil internações por ano. O serviço de pronto-socorro atende toda a região do Médio Vale do Itajaí, todavia não conta com pediatra de plantão na emergência, sendo a maior parte dos atendimentos realizados em adultos.

4.2.2 Cálculo da amostragem

O cálculo para determinar a quantidade de amostras necessárias foi realizado com o auxílio do programa *Sample Size Calculator* (*SYSTEM, [s.d.]). Blumenau possui uma população aproximada de 300 mil habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); sabendo que a incidência de PAC situa-se na faixa de 12 a cada 1.000 pessoas/ano (CABRE, 2009; CHAUVET; COSTA; FARIA, 2010; JOKINEN et al., 1993; JOSÉ; PERISELNERIS; BROWN, 2015; LIM et al., 2009; MANDELL, 2004; ROYSTED et al., 2015; SCHWARTZMANN et al., 2010), estima-se que ocorram 3,6 mil casos de pneumonia por ano. Determinando um intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 10%, a quantidade necessária de casos para que a pesquisa fosse estatisticamente representativa seria de 94 voluntários.

4.2.3 Amostras clínicas

Amostras de raspado de orofaringe e sangue foram coletadas de adultos com suspeita clínica de pneumonia atendidos no Hospital situado em Blumenau (SC), no período de abril de 2014 a novembro de 2014.

As amostras foram coletadas dos pacientes mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice B).

4.2.4 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- Pacientes imunocompetentes (sem uso de medicamentos quimioterápicos e HIV negativos);
- Pacientes com radiografia de tórax que apresentava infiltrado persistente (novo ou progressivo), consolidação e/ou cavitação;
- Pacientes que apresentaram pelo menos um dos sinais e sintomas: febre (temperatura axilar acima de 37,8°C) sem outra causa, ou leucopenia (abaixo de 4.000 cel/mm³), ou leucocitose (acima de 12.000 cel/mm³), ou alteração do nível de consciência (sem outra causa, em pacientes com mais de 70 anos de idade);
- Pacientes com pelo menos dois dos seguintes sinais: surgimento de secreção purulenta ou mudança das características da secreção ou aumento da secreção, ou início/agravamento da tosse, ou dispnéia, ou taquipnéia, ou aumento da necessidade de oferta de oxigênio, ausculta com crepitações ou sons bronquiais;
- Pacientes que não apresentavam exacerbação de doenças respiratórias (asma, bronquite e DPOC), ou não diagnosticados com pneumonia aspirativa;
- Pacientes sem histórico de internação em período anterior há um mês.

O raspado de orofaringe foi coletado de acordo com o “Manual de Orientação para Coleta, Acondicionamento e Transporte de Amostras Biológicas do Laboratório Central de Saúde Pública” (LACEN/SC). As amostras de orofaringe foram coletadas, de modo breve, da porção posterior da orofaringe, com *swab* de algodão, mantidas em 2 mL do meio de transporte 2SP (WAITES et al., 2001) e processadas em até 24 horas para a cultura de *M. pneumoniae*. Foram então congeladas a -20°C até a realização da extração e purificação do DNA para a detecção de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. pneumoniae* por PCR.

Para a sorologia de *M. pneumoniae*, 5 mL de sangue periférico foram coletados em tubo com gel separador (BD Vacutainer®, Plymouth, UK), de acordo com o documento “Técnicas para coleta de Sangue”, disponibilizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). O sangue foi então centrifugado por 5 minutos, a 3.000 g, e o soro armazenado a -20°C até o momento das análises.

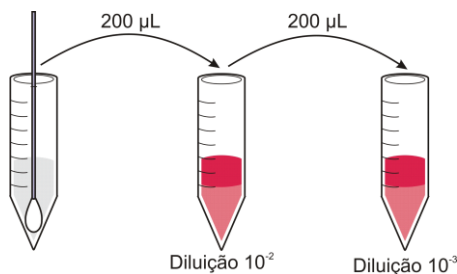
4.3 TESTES SOROLÓGICOS PARA *M. pneumoniae*

A detecção dos anticorpos IgG e IgM para *M. pneumoniae* em amostra de soro dos pacientes foi realizada por meio do teste de ELISA tipo sanduíche com o kit Serion ELISA classic (Würzburg, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. O resultado foi expresso em números absolutos, e os indivíduos foram classificados em três categorias: positivo, negativo e indeterminado.

4.4 CULTURA PARA *M. pneumoniae*

Para a cultura, 200 µL do meio de transporte com as amostras de orofaringe foram inoculados em dois tubos com meio Hayflick glicose bifásico modificado (WAITES et al., 2001), em diluições 10^{-2} e 10^{-3} , conforme observado na Figura 6. A diluição é necessária, pois as amostras podem possuir agentes inibitórios para o crescimento dos micoplasmas, os quais assim serão diluídos, possibilitando, dessa maneira, o eventual crescimento de *M. pneumoniae* (BÉBÉAR, 2007; WAITES et al., 2001).

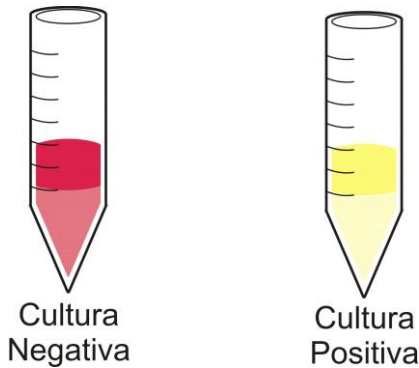
Figura 6 – Esquema representativo para cultura de *M. pneumoniae* a partir de amostras de raspado de orofaringe em meio de transporte.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

A seguir o meio foi incubado a 37°C, com presença de oxigênio, por até quatro semanas, e inspecionado diariamente para se observar qualquer mudança na coloração, de vermelho para amarelo, o que ocorre em virtude da fermentação da glicose, acidificando o meio, como pode ser observado na Figura 7. Devido ao seu tamanho reduzido, a bactéria não causa turvação no meio de cultura, sendo necessária a utilização de um indicador de pH (vermelho de fenol) para observar o seu crescimento. A turvação é um indicativo de contaminação (WAITES et al., 2001).

Figura 7 – Figura representativa de uma cultura negativa e positiva para *Mycoplasma pneumoniae* em meio Hayflick bifásico modificado.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.5 MÉTODOS MOLECULARES

4.5.1 Extração e purificação do DNA

Três metodologias foram utilizadas para a extração e purificação de DNA, a técnica conhecida como *salting-out*, o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, EUA) e o método automatizado com o equipamento QIAcube HT (Qiagen, EUA) com o kit Cadour Pathogen 96 QIAcube HT Kit (Qiagen, EUA).

As três metodologias foram utilizadas na mesma amostra de um paciente saudável (raspado de orofaringe), primeiramente para avaliar qual protocolo apresentava melhor pureza e quantidade de DNA por espectrofotometria a 260 e 280 nm (Nanovue plus Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Inglaterra).

4.5.1.1 *Salting-out*

Primeiramente, 500 μ L das amostras foram centrifugados a 12.000 g, por 15 minutos, em microtubos de 2,0 mL livres de DNAses, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi suspenso em 500 μ L de tampão de lise (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1%), e 2 μ L de proteinase K a 100 μ g/mL foram adicionados para a lise das células. Homogeneizou-se a mistura em agitador tipo vórtex por 15 segundos e os tubos foram incubados a 56°C por 60 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 100°C por dez minutos para inativação da proteinase K, e o DNA foi purificado (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Após a lise das células, foram adicionados 100 μ L de NaCl 6,0 M aos tubos e estes foram homogeneizados vigorosamente, em agitador tipo vórtex, por 15 segundos. Os tubos foram então centrifugados a 13.000 g por cinco minutos e o sobrenadante colocado em microtubos de 2,0 mL limpos e livres de DNAses. Adicionou-se 800 μ L de etanol absoluto para precipitar o DNA, e os tubos foram incubados por 16 horas, a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 g, e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado então 1 mL de etanol 70%, e os tubos foram centrifugados novamente a 13.000 g por 5 minutos para lavagem do DNA; o sobrenadante foi desprezado e os tubos foram deixados invertidos até a secagem. Adicionou-se 50 μ L de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para solubilizar o DNA (CARDOZO et al., 2009).

4.5.1.2 Extração por Kit Comercial

A extração por kit comercial foi realizada com 200 μ L da amostra de raspado de orofaringe, utilizando-se o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA), segundo as instruções do fabricante. O método consiste na utilização de microcolunas de centrifugação. O DNA se fixa a uma membrana de sílica em gel, e, com a utilização de tampões de lavagem, os contaminantes, cátions divalentes e proteínas passam por essa membrana durante a centrifugação. No final, obtém-se o DNA puro para ser eluído em tampão TE. O processamento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, obtendo-se, ao término do processo, o DNA eluído em 50 μ L de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

4.5.1.3 Extração com equipamento automatizado

A extração automatizada foi realizada no equipamento QIAcube HT (Qiagen, USA) com 200 µL da amostra de raspado de orofaringe. As amostras foram primeiramente extraídas a 100°C, em termobloco, para garantir a lise de bactérias Gram positivas. O processamento de purificação foi realizado de acordo com as especificações do protocolo e conforme as instruções do fabricante, obtendo-se, no final do processo, o DNA eluído em 50 µL de tampão TE.

O método de extração e purificação automatizada consiste na lise com proteinase K e tampões, no próprio equipamento, à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra lisada é transferida para uma placa de 96 poços com membrana de sílica, onde os ácidos nucleicos são adsorvidos, e, com a aplicação de uma pressão negativa, os contaminantes e inibidores da PCR são removidos em um processo com três lavagens. O DNA é então eluído com o tampão TE. Todo o processo é realizado pelo equipamento, somente há a necessidade de pipetar as amostras no local adequado e transferir os reagentes nas quantidades necessárias.

4.5.2 PCR

As reações de PCR foram realizadas no equipamento Biocycler MG96+ (Biosystems, Brasil) com reagentes da Thermo Scientific (Waltham, USA).

Em todas as reações, foram utilizados, como controle positivo, DNA de *M. pneumoniae* cepa M129 extraído de cultura positiva, DNA de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* extraídos de culturas puras e um controle negativo (H₂O ultrapura livre de DNase) para garantir a validade da reação e excluir qualquer causa de contaminação.

4.5.2.1 Detecção de *M. pneumoniae* por PCR de tempo final

Como referência, foram utilizados os iniciadores, tendo como alvo o gene da proteína citoadesina P1 de *M. pneumoniae*, descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993), sendo eles MP-P11 senso (5' – TGCCATCAACCCGCGCTTAAC – 3') e MP-P12 antissenso (5' – CCTTTGCAACTGCTCATAGTA – 3') (DE BARBEYRAC et al., 1993).

As reações foram realizadas com volume final de 50 µL, dos quais 10 µL eram da amostra, de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 1 – Concentrações de reagentes para a reação de PCR de *M. pneumoniae*, com iniciadores descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993).

	Tampão	MgCl ₂ (25 mM)	Iniciadores	dNTPs (100 mM)	Taq
Concentração	1x	1,5 mM	1 μM	200 μm cada	1,5 U
Volume em μL	5	3	5	0,4	0,3

Legenda: MgCl₂: Cloreto de Magnésio; dNTPs: desoxinucleotídeo trifosfato; U: unidades. Fonte: Desenvolvido pela autora.

As condições de amplificação do DNA foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. O tamanho do produto de PCR esperado era de 466 pb.

4.5.2.2 Desenho de novos iniciadores para o gene de citoadesina P1 para *M. pneumoniae*

A proposta para o desenho de novos iniciadores foi a atualização, com base na utilização de todas as sequências referentes ao gene de citadesina P1 disponíveis na base de dados *Genbank* até o desenvolvimento deste estudo. Para isso, todas as sequências do gene de citoadesina P1 para *M. pneumoniae* foram importadas do *Genbank* no formato *Fasta*. Em seguida, utilizou-se o programa BioEdit (HALL, 1999) para fazer o alinhamento das sequências pela ferramenta CLUSTAL W, observando-se as regiões conservadas dessas sequências.

O desenho dos iniciadores foi realizado com auxílio do programa PrimerSelect (Lasergene), para o qual a sequência AF286371.1 (*Mycoplasma pneumoniae* P1 cytheadhesin (P1) gene, complete cds) foi utilizada como modelo.

Os seguintes iniciadores foram selecionados:

Iniciador senso: 5' – ACACCGCGCCTTTGAGTATAGG – 3'

Iniciador antissenso: 5' – CATCCGTAGGGTGTGAAGAGTTGC – 3'

O tamanho do produto esperado era de 358 pb.

4.5.2.2.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi baseada em protocolo padrão descrito anteriormente (INNIS; GELFAND, 1990), realizando-se reações com volume final de 10 μ L. Utilizou-se água ultrapura suficiente para completar o volume final, tampão da enzima 1x, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs) e 1,0 unidade (U) de Taq DNA polimerase.

Para otimização, foram realizadas reações com concentrações variadas dos iniciadores, juntamente com concentrações variadas de $MgCl_2$ (Cloreto de Magnésio), de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2 – Padronização da PCR para *M. pneumoniae* com iniciadores desenhados neste estudo.

Iniciadores	Concentrações de $MgCl_2$				
	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM
0,1 μM	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM
0,2 μM	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM
0,3 μM	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM
0,4 μM	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM
0,5 μM	0,75 mM	1,00 mM	1,50 mM	2,0 mM	2,50 mM

Legenda: $MgCl_2$: Cloreto de Magnésio. Cada concentração de iniciadores foi utilizada com concentrações variadas de $MgCl_2$. Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.5.2.3 Teste de sensibilidade dos iniciadores para *M. pneumoniae*

Para o teste de sensibilidade foram coletadas amostras de raspado de orofaringe de um paciente saudável e, em cada amostra, foram adicionados 50 μ L de uma cultura positiva de *M. pneumoniae* M129 ou de diluições seriadas dessa cultura, os quais foram inoculados no meio de transporte (2SP), mimetizando concentrações decrescentes de bactéria numa amostra biológica, da seguinte forma:

Amostra PS+: *swab* de orofaringe + 50 μ L de cultura positiva de *M. pneumoniae* M129

Amostra PS1: *swab* de orofaringe + 50 μ L da diluição 1:10 de cultura positiva de *M. pneumoniae* M129 (Diluição 10^{-1})

Amostra PS2: *swab* de orofaringe + 50 μ L da diluição 1:100 de cultura positiva de *M. pneumoniae* M129 (Diluição 10^{-2})

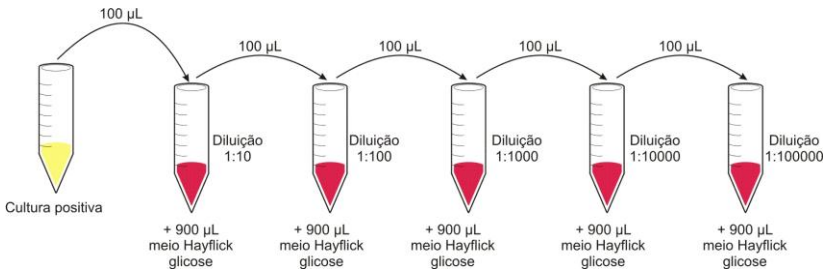
Amostra PS3: *swab* de orofaringe + 50 μ L da diluição 1:1.000 de cultura positiva de *M. pneumoniae* M129 (Diluição 10^{-3})

Amostra PS4: *swab* de orofaringe + 50 μ L da diluição 1:10.000 de cultura positiva de *M. pneumoniae* M129 (Diluição 10^{-4})

Em seguida, foi realizada a extração e purificação de 200 μ L dessas amostras pelo método automatizado no equipamento QIACube HT (Qiagen, USA), obtendo-se o DNA eluído em 50 μ L de tampão TE. A reação da PCR foi realizada em duplicata para o gene de citoadesina P1 de *M. pneumoniae* com os iniciadores desenhados neste estudo e com os iniciadores descritos anteriormente por de Barbeyrac e colaboradores (1993).

Para avaliar a quantidade de bactérias presentes no inóculo, foi realizada a titulação da cultura inicial de *M. pneumoniae* M129 utilizada no teste de sensibilidade descrito acima. A titulação consiste em adicionar 100 μ L da cultura inicial a 900 μ L de meio de cultura Hayflick glicose, obtendo uma diluição 1:10. Em seguida, adicionou-se 100 μ L da primeira diluição a 900 μ L de meio de cultura, obtendo-se uma diluição 1:100, e assim sucessivamente, até obter uma diluição de 1:100.000 (Figura 8). O último tubo onde foi observado o crescimento (alteração da cor vermelha para amarela) é considerado a concentração de 1 CCU/mL (do inglês *Color Changing Units*, unidades de mudança de cor), 1 CCU corresponde de 10 a 100 células de *M. pneumoniae* (LOENS et al., 2002).

Figura 8 – Esquema representativo das diluições realizadas para a titulação de *M. pneumoniae* cepa M129.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.5.2.4 Análise das características e especificidade dos iniciadores para *M. pneumoniae*

A análise *in silico* da especificidade dos iniciadores foi realizada com o auxílio do programa Primer-Blast (NCBI) e a análise das características dos iniciadores foi realizada no programa PrimerSelect (Lasergene).

A análise da especificidade *in vitro* dos iniciadores desenhados neste estudo para detecção de *M. pneumoniae* foi realizada por meio da utilização de DNA extraído e purificado de cepas de *Acholeplasma laidlawii* PG8, *Mycoplasma orale* CH19299, *Mycoplasma salivarium* PG20 e *Mycoplasma fermentans* IPS8, frequentemente encontrados como micoplasmas comensais da orofaringe, e *M. genitalium* ATCC 33530 por estar intimamente relacionado ao *M. pneumoniae* (DE BARBEYRAC et al., 1993; WAITES; TALKINGTON, 2004). O DNA de *S. pneumoniae* SI15 e de *H. influenzae* SI15 também foi utilizado na análise das especificidades.

4.5.2.5 PCR para detecção de *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

O alvo de escolha para a detecção de *S. pneumoniae* foi o gene da lipoproteína do sistema de transporte de ferro ABC (*piaA*) com os iniciadores descritos previamente por WHALAN e colaboradores (2006) com algumas modificações, como a retirada de dois nucleotídeos na porção 5' (AG) e adição de dois nucleotídeos na porção 3' (AG) do iniciador senso; e retirada de 3 nucleotídeos na porção 3' (TAT) do iniciador antissenso. Obteve-se, então, os seguintes iniciadores: *piaA*

senso (5'- AGCATGCGCCTGATAAAATAG – 3') e *piaA* antissenso (5'- CATGAGGCTGCTAACGGTG – 3').

O alvo de escolha para a detecção de *H. influenzae* foi o gene da proteína externa P6 (*ompP6*) (KETEL; WEVER; ALPHEN, 1990), sendo que os iniciadores sofreram algumas modificações, como a adição de dois nucleotídeos na porção 3' (TG) do iniciador senso; e a adição de 1 nucleotídeo na porção 5' (C) no iniciador antissenso, obtendo-se os seguintes iniciadores: HI-IV (5' – ACTTTTGGCGGTTACTCTGTTG - 3') e HI-V (5' CCTAATTTACCAGCATCAACACC — 3').

A reação de PCR foi realizada com um volume final de 10 µL, sendo utilizados 2 µL da amostra de DNA purificado, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 3 – Concentrações de reagentes utilizados para PCR com os iniciadores para *H. influenzae* e *S. pneumoniae*.

	Água	Tampão de reação	MgCl ₂ (25 mM)	Iniciadores	dNTPs (100 mM)	Taq
Concentração	q.s.p.	1x	1,5 mM	1 µM	200 µm cada	1,0 U
µL	4,12	1	0,6	1	0,08	0,2

Legenda: MgCl₂: Cloreto de Magnésio; dNTPs: desoxinucleotídeo trifosfato; U: unidades. Fonte: Desenvolvido pela autora.

As condições de reação de amplificação foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e 72°C por 7 minutos para *H. influenzae* e 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 50°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos para *S. pneumoniae*.

O tamanho do produto esperado era de 269 pb para *H. influenzae* e 844 pb para *S. pneumoniae*.

4.5.2.6 Teste de sensibilidade dos iniciadores para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

Preparou-se uma solução com concentração de 10 ng/µL de DNA das cepas de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* caracterizadas bioquimicamente. Em seguida, foi realizada uma série de diluições de 10 vezes, obtendo as seguintes concentrações de DNA: 1 ng/µL, 0,1 ng/µL, 0,01 ng/µL e 0,001 ng/µL para *S. pneumoniae* e 1 ng/µL, 0,1 ng/µL e 0,01 ng/µL para *H. influenzae*.

A reação de PCR foi realizada em duplicata em todas as concentrações de DNA das bactérias para avaliar o limite de detecção da técnica.

4.5.2.7 Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% para *M. pneumoniae* e 2% para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, adicionando 8 µL do produto e 2 µL de tampão da amostra (Glicerol 50%, 0,25% Xilenocianol, 0,25% azul de bromofenol, q.s.p. TBE). O gel foi corado com brometo de etídeo a 1 µg/mL e fotografado usando transluminador UV. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Os tamanhos dos produtos esperados estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo e tamanho do produto.

Gene		Iniciador	Produto	Referência	Bactéria
citoaderência P1	F	TGCCATCAACCCGCGCTTAAC	466pb	(de Barbeyrac et al., 1993)	<i>M. pneumoniae</i>
	R	CCTTTGCAACTGCTCATAGTA			
citoaderência P1	F	ACACCCGCGCTTTGAGTATAGG	358pb	Este estudo	<i>M. pneumoniae</i>
	R	CATCCGTAGGGTGTGAAGAGTTGC			
piaA	F	AGCATGCGCTGATAAAATAG	844pb	(Whalan et al., 2006)	<i>S. pneumoniae</i>
	R	CATGAGGCTGTAACGGTG			
ompP6	F	ACTTTTGGCGGTTACTCTGTTG	269pb	(Ketel, Wever, Alphen, 1990)	<i>H. influenzae</i>
	R	CCTAATTTACCAGCATCAACACC			

Legenda: F: iniciador senso; R: iniciador antissenso; Fonte: Desenvolvido pela autora.

4.6 DEFINIÇÃO DA ETIOLOGIA

A etiologia foi classificada como definitiva quando *M. pneumoniae* foi isolado de cultura e confirmado pela PCR do gene P1 com os iniciadores descritos anteriormente (DE BARBEYRAC et al., 1993) e/ou os desenhados neste estudo; ou quando ele foi detectado em amostras de raspado de orofaringe pela PCR para o gene P1 de citoadesina de *M. pneumoniae*, utilizando ambos iniciadores; ou quando o teste de ELISA apresentou-se positivo para anticorpos IgM.

A etiologia foi classificada como provável quando o DNA de *S. pneumoniae* ou de *H. influenzae* foi detectado pela PCR, correspondendo a $\geq 10^5$ UFC/mL (HOLTER et al., 2015; KAIS et al., 2006).

4.7 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA AO CONSENSO BRASILEIRO SOBRE PNEUMONIAS

Uma análise retrospectiva dos prontuários dos pacientes foi realizada, obtendo-se as seguintes informações: comorbidades dos pacientes, idade, laudo de radiografia, tempo de internação, antimicrobianos prescritos, necessidade de internação em UTI, desfecho clínico, exames microbiológicos (cultura de escarro, aspirado traqueal e lavado broncoalveolar; coloração de Gram de escarro e líquido pleural; urocultura; hemocultura e pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes em escarro).

As informações necessárias para estratificação dos pacientes de acordo com a escala CURB-65 (Confusão mental, ureia > 50 mg/dL, frequência respiratória ≥ 30 ciclos/minuto, pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou pressão arterial diastólica ≤ 60 mmHg e idade ≥ 65 anos) (LIM et al., 2009) foram obtidas dos prontuários no dia de admissão hospitalar, para avaliação da necessidade de internação e risco de mortalidade.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

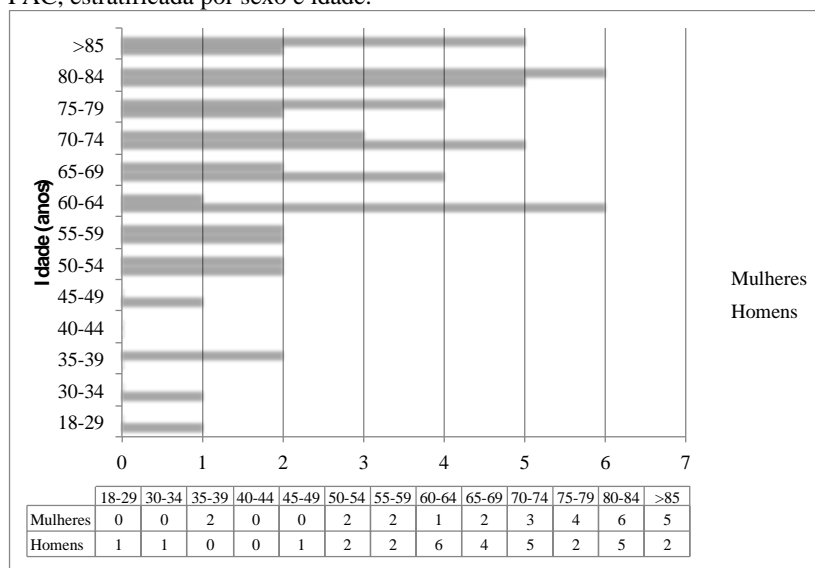
Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa Microsoft Excel para obtenção da média e desvio padrão. As variáveis nominais foram sumarizadas como números absolutos e percentuais, e as variáveis numéricas foram sumarizadas como média, desvio padrão e valores máximos e mínimos. A análise da significância estatística foi realizada pelo Teste Exato de Fisher, Teste Chi-quadrado, Chi-quadrado de aderência, Teste k das proporções independentes e teste T de student; considerando intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE PNEUMONIA AVALIADOS

Durante o período da coleta das amostras (abril 2014 – novembro 2014), 58 pacientes se encaixaram nos critérios de inclusão. As amostras de raspado de orofaringe foram coletadas de todos os pacientes, todavia foi possível coletar amostras de sangue em 94,8% (n=55) dos casos. Observou-se que a pneumonia foi mais frequente nos homens (53,45%) do que nas mulheres (46,55%), entretanto, sem diferença significativa ($p=0.994$). Curiosamente, entre 60 e 74 anos, houve um predomínio de pacientes do sexo masculino, verificando-se uma situação oposta acima dos 75 anos ($p=0.03$) (Figura 9). A média da idade dos pacientes foi de 69,5 anos ($\pm 15,23$; 25 – 100 anos). Como esperado, os casos de pneumonia foram mais frequentes nos idosos, dentre os quais 65,52% (n=38) possuíam idade maior que 65 anos ($p=0,01$).

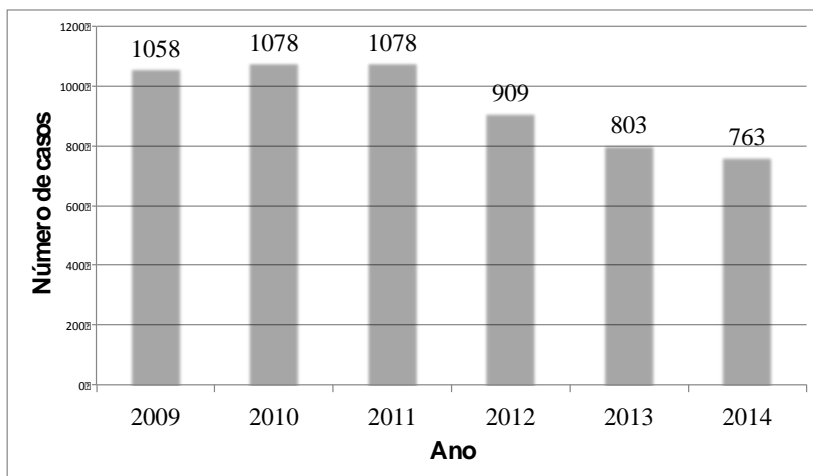
Figura 9 - Distribuição dos doentes incluídos no estudo com diagnóstico de PAC, estratificada por sexo e idade.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

O número de amostras necessárias estimado para este estudo apresentar significância estatística era de 94 pacientes com diagnóstico de PAC, todavia apenas 58 pacientes se encaixaram nos critérios de inclusão. Alguns fatores contribuíram para um número menor de casos, sendo eles: apenas pacientes acima de 18 anos eram atendidos no pronto-atendimento do hospital, por não haver pediatra de plantão. Sabendo que os casos de pneumonia são mais frequentes em idosos e crianças, uma parcela significativa de casos foi perdida (MANDELL, 2004; SCHMIDT; KAUFMANN; WOLFF, 2007; TOYOSHIMA; ITO; GOUVEIA, 2005). A atenção primária, como postos, centros e unidades de saúde são capazes de resolver até 80% das necessidades e problemas de saúde (BRASIL, 2007); e as pneumonias bacterianas estão listadas em condições sensíveis à atenção primária (ALFRADIQUE et al., 2009; NEDEL et al., 2010). Em um estudo realizado no Sul de Santa Catarina, os autores observaram uma diminuição na tendência de hospitalização nos casos de pneumonia em pacientes acima de 60 anos, quando a atenção primária era eficiente (ELIAS; MAGAJEWSKI, 2008), assim uma parcela de casos de baixa gravidade poderiam ter sido atendido nessas unidades, podendo então ser um dos motivos de redução dos casos no pronto-atendimento. Outro fator que deve ser levado em conta é a diminuição significativa ($p=0,01$) dos casos de pneumonia no ano de 2013 e 2014 em comparação com os anos de 2009 a 2012, refletido pelo número de internações, como pode ser observado na Figura 10. Além das causas citadas acima, o diagnóstico de pneumonia só foi confirmado com a presença de infiltrado intersticial, cavitação e/ou consolidação na radiografia torácica no entanto, esses achados podem estar ausentes em um quinto dos pacientes com PAC na radiografia inicial (ERDEM et al., 2014; HAGAMAN et al., 2009)

Figura 10 – Número de internações por pneumonia em Blumenau-SC, classificadas de acordo com o ano.



Fonte: DATASUS.

A média de idade foi semelhante a de outros estudos, mesmo àqueles que incluíram somente pacientes acima dos 50 anos ou 65 anos, entre os tratados ambulatoriamente e os hospitalizados (CASTRO et al., 2008; DONALISIO et al., 2011; HOLTER et al., 2015; KOTHE et al., 2008), o que demonstra maior prevalência de PAC na população idosa (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2004).

Dos pacientes diagnosticados com PAC, 34,48% (20) possuíam menos de 65 anos e 65,52% (38) tinham idade ≥ 65 anos, sendo essa diferença significativa ($p=0.01$). Outros estudos encontraram dados semelhantes, nos quais a prevalência em idosos (≥ 65 anos) foi de 59% a 70,6%, sendo a idade considerada um possível fator de risco para a PAC (BLASI et al., 2008; FARR et al., 2000; KOIVULA; STEN; MÄKELÄ, 1994; LIM et al., 2001; ROYSTED et al., 2015).

Os pacientes foram analisados de acordo com as comorbidades (Tabela 4), sendo elas: hipertensão arterial sistêmica (HAS), DPOC, diabetes melito (DM), ICC, hipotireoidismo, asma, doença renal crônica (DRC), fibrose pulmonar, doença de Parkinson e outras (doença coronariana, doença diverticular de cólon, bronquite, doença de Alzheimer, artrite reumatoide e nefrolitíase, insuficiência renal crônica); e fatores associados como: tabagismo, tabagismo passivo, tabagismo prévio, etilismo, etilismo prévio, infarto agudo do miocárdio (IAM)

prévio, dislipidemias, acidente vascular cerebral (AVC) prévio e outros (obesidade, cirrose, neoplasia e anemia ferropriva). Em nosso estudo, 98,28% dos indivíduos (n=57) possuíam algum fator associado e/ou comorbidades, sendo que 15,52% (n=9) apresentavam pelo menos um, 32,76% (n=19) apresentavam dois, 22,41% (n=13) apresentavam três, 18,97% (n=11) apresentavam quatro e 8,62% (n=5) apresentavam cinco ou mais fatores associados e/ou comorbidades. O número de pacientes com uma ou mais comorbidades foi maior do que o de pacientes sem comorbidades ($p=0,001$), bem como do que aqueles que possuíam um ou mais fatores associados ($p=0,001$).

A HAS foi a comorbidade mais prevalente (50,00%; n=29), seguida da DPOC (37,93%; n=22), DM (25,86%; n=15) e ICC (17,24%; n=10). Os fatores associados mais prevalentes foram: tabagismo prévio (41,38%; n=24), dislipidemia (15,52%; n=9), IAM prévio (13,79%; n=8) e tabagismo (12,07%; n=7). Houve diferença ($p=0,001$) para a ausência das comorbidades e fatores associados: DM, ICC, Hipotireoidismo, asma, DRC, fibrose pulmonar, doença de Parkinson, dislipidemia, IAM prévio, tabagismo, AVC prévio, etilismo, etilismo prévio, tabagismo passivo; ou seja, entre os pacientes com PAC, é mais provável que não possuam essas comorbidades do que possuam. O tabagismo prévio foi o mais prevalente ($p=0,002$) entre os fatores associados.

Tabela 4 – Características dos pacientes diagnosticados com PAC no presente estudo.

Característica		Valor	DP
Idade média (anos)		69,5	± 15,23 (25-100)
≥ 65		65,52%	38
< 65		34,48%	20
Homens		53,45%	31
Mulheres		46,55%	27
Comorbidades + fatores associados	0	1,72%	1
	1	15,52%	9
	2	32,76%	19
	3	22,41%	13
	4	18,97%	11
	≥ 5	8,62%	5
Comorbidades	HAS	50,00%	29
	DPOC	37,93%	22
	DM	25,86%	15
	ICC	17,24%	10
	Hipotireoidismo	6,90%	4
	Asma	6,90%	4
	DRC	5,17%	3
	Fibrose Pulmonar	3,45%	2
	Doença de Parkinson	3,45%	2
	Outras	13,79%	8
Fatores Associados	Tabagismo prévio	41,38%	24
	Dislipidemia	15,52%	9
	IAM prévio	13,79%	8
	Tabagista	12,07%	7
	AVC prévio	6,90%	4
	Etilismo prévio	3,45%	2
	Etilismo	1,72%	1
	Tabagismo passivo	1,72%	1
	Outros	6,90%	4

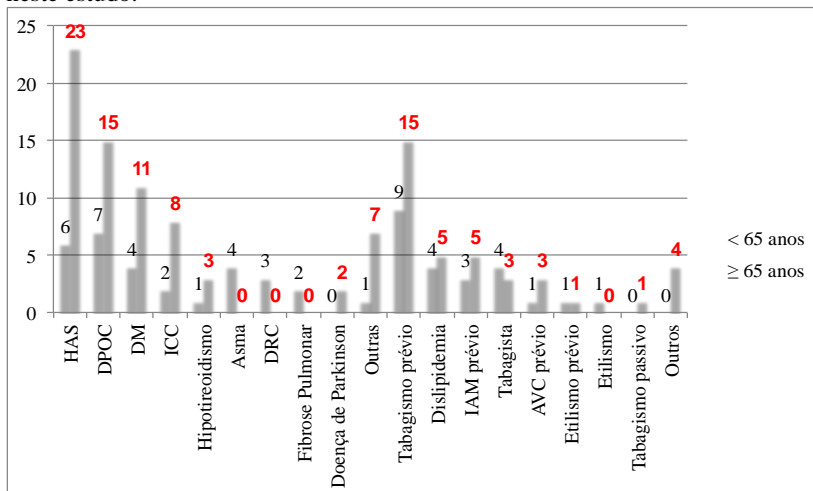
Legenda: DP: desvio padrão; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DM: diabetes melito; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DRC: doença renal crônica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral. Nota: Resultados apresentados por porcentagens (%) e números absolutos (à direita). Fonte: Desenvolvido pela autora.

Entre os idosos (≥ 65 anos), a HAS (60,53%; n=23), DPOC (39,47%; n=15), DM (28,95%; n=11) e ICC (21,05%; n=8) foram as

comorbidades mais frequentes e o tabagismo prévio (39,47%; n=15), dislipidemia (13,16%; n=5) e IAM prévio (13,16%; n=5) foram os fatores associados mais prevalentes. Nos adultos (abaixo de 65 anos), as doenças subjacentes mais frequentes foram: a DPOC (35%; n=7), HAS (30%; n=6) e a DM (20%; n=4); e os fatores associados mais prevalentes foram: tabagismo prévio (45%; n=9), tabagismo (20%; n=4) e dislipidemia (20%; n=4) (Figura 11). Dentre as comorbidades, a asma foi mais frequente ($p=0,01$) nos adultos (< 65 anos) em comparação com os idosos, não havendo diferença em relação aos fatores associados. Nos idosos e adultos (< 65 anos) a ausência de ICC, hipotireoidismo, asma, DRC, fibrose pulmonar e doença de Parkinson foi significativamente associada ($p<0,01$). Todavia, não houve diferença para a presença das comorbidades tanto nos pacientes adultos quanto nos pacientes idosos.

Os idosos não apresentam um número maior de comorbidades ou fatores de risco comparados com os adultos com menos de 65 anos ($p>0,05$). Tais dados diferem de outros estudos em que a presença de uma ou mais comorbidades foi mais prevalente em pacientes idosos (COLICE et al., 2004; CORRÊA et al., 2001; GLEASON et al., 1999; KOTHE et al., 2008; LIM et al., 2001; WESEMANN et al., 2015).

Figura 11 – Gráfico das características dos pacientes de acordo com a idade neste estudo.



Legenda: HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DM: diabetes melito; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DRC: doença renal crônica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Entre as mulheres, a HAS (59,26%; n=16), DM (25,93%; n=7) e a DPOC (22,22%; n=6) foram as comorbidades mais prevalentes e os fatores associados foram: tabagismo prévio (25,93%; n=7), dislipidemia (18,52%; n=5) e IAM prévio (14,81%; n=4). Entre os homens, os fatores associados e comorbidades mais prevalentes foram: DPOC (51,61%; n=16), HAS (41,94%; n=13), DM (25,81%; n=8), tabagismo prévio (54,84%; n=17) e tabagismo (19,35%; n=6). A prevalência da DPOC ($p=0,04$) e tabagismo ($p=0,05$) prévio foi mais frequente nos homens se comparado com as mulheres. Em um estudo de revisão realizado por Torres e colaboradores (2013), o hábito do tabagismo, tanto prévio como atual, e a presença de doenças respiratórias crônicas, como o DPOC, foram relatados como fatores de risco para adquirir PAC. Assim, deduz-se que a prevalência ligeiramente maior nos homens esteja relacionada a essa diferença. O tabagismo prévio apresentou diferença significativa dentre os fatores associados, quando observado somente nos homens ($p<0,01$). A prevalência da HAS foi maior em comparação com as outras comorbidades ($p<0,01$), não havendo diferença entre os fatores associados nas mulheres ($p>0,05$).

Não houve diferença entre a ausência ou presença de comorbidades ou fatores associados tanto nos homens como nas mulheres, quando verificados isoladamente ($p>0,05$), ou seja, a presença de alguma comorbidade não foi significativa quando observada no grupo de homens isoladamente e no grupo das mulheres isoladamente. A Tabela 5 apresenta as características dos pacientes de acordo com o sexo.

Tabela 5 – Características dos pacientes de acordo com o sexo neste trabalho.

		Homens		Mulheres		p
		%	n	%	n	
Comorbidades + fatores associados	0	0,00%	0	3,70%	1	
	1	16,13%	5	14,81%	4	
	2	32,26%	10	33,33%	9	
	3	25,81%	8	18,52%	5	
	4	12,90%	4	22,22%	6	
	≥ 5	12,90%	4	7,40%	2	
Comorbidades	HAS	41,94%	13	59,26%	16	0,29
	DPOC	51,61%	16	22,22%	6	0,04
	DM	25,81%	8	25,93%	7	0,99
	ICC	16,13%	5	18,52%	5	0,81
	Hipotireoidismo	3,23%	1	11,11%	3	0,33
	Asma	6,45%	2	7,41%	2	1,00
	DRC	6,45%	2	3,70%	1	1,00
	Fibrose Pulmonar	6,45%	2	0,00%	0	0,49
	Doença de Parkinson	0,00%	0	7,41%	2	0,21
Outras	12,90%	4	14,81%	4		
Fatores associados	Tabagismo prévio	54,84%	17	25,93%	7	0,05
	Dislipidemia	12,90%	4	18,52%	5	0,72
	IAM prévio	12,90%	4	14,81%	4	1,00
	Tabagista	19,35%	6	3,70%	1	0,11
	AVC prévio	6,45%	2	7,41%	2	1,00
	Etilismo prévio	3,23%	1	3,70%	1	1,00
	Etilismo	3,23%	1	0,00%	0	1,00
	Tabagismo passivo	0,00%	0	3,70%	1	0,47
	Outros	0,00%	0	14,81%	4	

Legenda: HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DM: diabetes melito; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DRC: doença renal crônica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os sinais e sintomas foram obtidos de acordo com os critérios representados na Figura 2 para o diagnóstico de pneumonia, sendo que a dispneia (79,31%; n=46), a tosse (72,41%; n=42), secreção purulenta e crepitações (65,52%; 38) foram mais prevalentes, como pode ser visto na tabela 6. Observou-se diferença na presença dos sinais e sintomas: dispneia, tosse (p=0,001), secreção purulenta e crepitações na ausculta pulmonar (p=0,01), indicando que os pacientes com pneumonia têm maior probabilidade de apresentar um desses sintomas. Assim, podemos sugerir tais sinais e sintomas como indicativos de pneumonia na

população em que o estudo foi realizado. Tais achados entram em controvérsia com o estudo realizado por Bantar e colaboradores (2010), que indica que a presença de crepitações na ausculta pulmonar não é suficientemente sensível para assegurar o diagnóstico de PAC, todavia a presença de sons bronquiais e crepitações foi relevante ($p=0,001$) em comparação com a ausência delas. A presença significativa de crepitações na ausculta pulmonar corrobora os estudos prévios, que implicam tal achado para o diagnóstico de pneumonia; dessa forma, os autores referem uma ausência de diagnóstico de pneumonia quando não há crepitações na ausculta pulmonar (MELBYE et al., 1992; PARTOUCHE et al., 2015).

Observou-se também que 82,76% ($n=46$) dos pacientes apresentam quatro ou mais sinais e sintomas, sendo essa diferença significativa ($p=0,001$). Isso indica, possivelmente, que os casos de PAC se caracterizam com a presença de quatro ou mais sintomas.

O infiltrado intersticial (62,07%; $n=36$) foi o achado mais prevalente nas radiografias torácicas, no entanto, não é significativo ($p=0,06$), e 18,97% ($n=11$) dos pacientes apresentavam mais de um achado. Dentre os achados da radiografia torácica, o infiltrado intersticial ($p=0,0000$) e a consolidação ($p=0,0001$) foram mais prevalentes que a cavitação, corroborando o estudo realizado anteriormente, em que a cavitação é um achado raro nas PACs (ERDEM et al., 2014). Melbye e colaboradores (1992) descreveram a dispneia como fator preditivo para o infiltrado nos achados radiológicos, todavia os achados neste estudo não encontraram diferença para a dispneia ($p=1,00$).

Tabela 6 – Prevalência dos sinais e sintomas em pacientes com PAC no presente estudo, de acordo com a idade.

		Todos os pacientes		< 65 anos		≥ 65 anos		p
		%	n	%	n	%	n	
Sinais e sintomas	Dispneia	79,31	46	65,00	13	86,84	33	0,11
	Tosse	72,41	42	80,00	16	68,42	26	0,54
	Secreção purulenta	65,52	38	75,00	15	60,53	23	0,42
	Crepitações	65,52	38	45,00	9	76,32	29	0,04
	Leucocitose	60,34	35	40,00	8	71,05	27	0,04
	Febre	58,62	34	65,00	13	55,26	21	0,66
	Taquipneia	56,90	33	55,00	11	57,84	22	0,83
	Confusão mental > 70 anos	22,41	13	0,00	0	34,21	13	0,00
	Sons bronquiais	8,62	5	20,00	4	2,63	1	0,04
	Leucopenia	3,45	2	10,00	2	0,00	0	0,11
Quantidade de sinais e sintomas	1	1,72	1	5,00	1	0,00	0	
	2	6,90	4	10,00	2	5,26	2	
	3	8,62	5	10,00	2	7,89	3	
	≥4	82,76	48	75,00	15	86,84	38	
Achados radiológicos	Infiltrado	62,07	36					
	Cavitação	3,45	2					
	Consolidação	53,45	31					
	Mais de um	18,97	11					

Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os sinais e sintomas mais prevalentes nos adultos (< 65 anos) foram tosse (80%; n=16), secreção purulenta (75%; n=15) e dispneia (65%; n=13); já nos idosos (≥ 65 anos), a dispneia (86,84%; n=33), as crepitações na ausculta pulmonar (76,32%; n=29) e leucocitose (71,05%; n=27) foram mais prevalentes (Tabela 6). A leucocitose (p=0,04), a confusão mental (p=0,00) e as crepitações (p=0,04) na ausculta pulmonar foram mais frequentes nos idosos e os sons bronquiais (p=0,04), nos adultos (< 65 anos). Dentre a presença ou ausência dos sinais e sintomas nos adultos (< 65 anos), a presença da tosse (p=0,007) e a ausência dos sons bronquiais (p=0,007) e leucopenia (p=0,001) foram significantes, ou seja, a chance de um adulto (< 65 anos) apresentar tosse em casos de PAC é maior que a chance de não

apresentar, o caso inverso acontece para os sons bronquiais e leucopenia. Riquelme e colaboradores (1997) encontraram a ausência de sinais clássicos de pneumonia, como tosse, febre e dispneia, em 69% dos idosos. A ausência de pelo menos um dos sintomas clássicos de pneumonia nos idosos (tosse, febre e dispneia), neste estudo, foi observada em 68,42% (n=26) dos casos, verificando-se diferença significativa ($p=0,02$) em comparação aos idosos que apresentaram todos os sintomas clássicos (31,58%; n=12). Entretanto, a presença de dispneia ($p=0,001$), tosse ($p=0,02$), leucocitose ($p=0,009$) e crepitações na ausculta pulmonar ($p=0,001$) foi mais frequente em relação à ausência desses sinais, podendo indicar que a maioria dos idosos apresenta pelo menos um desses sinais e sintomas na PAC, sendo a leucocitose e a confusão mental os indicativos mais comuns nessa população (MELBYE et al., 1992; RIQUELME et al., 1997). A presença significativa de dispneia e tosse difere de outros estudos que indicam a falta de sintomas clássicos de PAC nos idosos.

Dos 58 pacientes incluídos no estudo, apenas 15,52% (n=9) foram tratados ambulatoriamente e 84,48% (n=49) foram hospitalizados, sendo essa diferença significativa ($p=0,001$). Em diferentes estudos, a taxa de internação foi menor ($p<0,05$) comparada com os dados neste levantamento, observando-se uma taxa de internação entre 25,2% a 45,3% (CUPURDIJA et al., 2015; JACKSON et al., 2004; KOTHE et al., 2008). A elevada taxa de hospitalização pode estar relacionada à atenção primária, como citada anteriormente; assim, os casos mais brandos poderiam ter sido atendidos nas unidades, centros e postos de saúde e os casos mais graves no hospital, refletindo em uma prevalência maior de hospitalização. Dos pacientes tratados ambulatoriamente, 77,78% (n=7) eram mulheres e 22,22% (n=2) homens ($p=0,07$); 66,67% (n=6) possuíam idade menor que 65 anos e 33,33% (n=3) eram idosos (≥ 65 anos) ($p=0,05$), embora essas diferenças não sejam significativas. As comorbidades e fatores associados mais frequentes nos pacientes tratados ambulatoriamente foram: HAS (44,44%; n=4) e asma (22,22%; n=2) (Tabela 7).

Dentre os pacientes internados, 59,18% (n=29) eram homens e 40,82% (n=20) eram mulheres, não havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,19$). Destes, 28,57% (n=14) possuíam idade inferior a 65 anos e 71,43% (n=28) eram idosos (≥ 65 anos), indicando que a internação foi mais frequente para os idosos ($p=0,03$). As comorbidades e fatores de risco mais prevalentes nos pacientes internados foram: HAS (51,02%; n=25), DPOC (44,90%; n=22), DM (28,57%; n=14) e tabagismo prévio (46,94%; n=23), sendo que 57,14%

(n=28) apresentavam três ou mais comorbidades e/ou fatores associados (Tabela 7). Todos os pacientes internados (n=49) apresentaram uma ou mais comorbidades, achados semelhantes foram encontrados em diferentes estudos, em que 74,1% a 93,6% apresentavam uma ou mais comorbidades (BLASI et al., 2008; COLICE et al., 2004).

Uma proporção aparentemente maior dos pacientes idosos foi internada em comparação com os que foram tratados ambulatoriamente ($p=0,05$), o que sugere que a idade é um fator para a decisão de internação ou gravidade da PAC, como relatado por Osuna e colaboradores (2006). Entre os pacientes hospitalizados, a ausência da DM, hipotireoidismo, asma, DRC, fibrose pulmonar, doença de Parkinson, tabagismo prévio, IAM prévio, tabagismos, AVC prévio, etilismo e etilismo prévio e tabagismo passivo foi significativa ($p<0,05$).

Segundo Jackson e colaboradores (2004), Colice e colaboradores (2007) e Osuna e colaboradores (2006), pacientes com PAC e comorbidades são mais propensos a serem internados, bem como os tabagistas (JACKSON et al., 2004), todavia, no presente estudo, não foi observado esse perfil ($p=0,15$).

Tabela 7 – Características dos pacientes internados e tratados ambulatoriamente analisados neste estudo.

		Ambulatoriais		Hospitalizados		P
		%	n	%	n	
Sexo	Masculino	22,22	2	59,18	29	0,07
	Feminino	77,78	7	40,82	20	0,07
Idade	< 65 anos	66,67	6	28,57	14	0,05
	≥ 65 anos	33,33	3	71,43	35	0,05
Comorbidades + fatores associados	0	11,11%	1	0,00%	0	
	1	55,56%	5	8,16%	4	
	2	22,22%	2	34,69%	17	
	≥ 3	11,11%	1	57,14%	28	
Comorbidades	HAS	44,44%	4	51,02%	25	1,00
	DPOC	0,00%	0	44,90%	22	0,01
	DM	11,11%	1	28,57%	14	0,42
	ICC	0,00%	0	20,41%	10	0,33
	Hipotireoidismo	0,00%	0	8,16%	4	1,00
	Asma	22,22%	2	4,08%	2	0,11
	DRC	11,11%	1	4,08%	2	0,40
	Fibrose Pulmonar	0,00%	0	4,08%	2	1,00
	Doença de Parkinson	11,11%	1	2,04%	1	0,29
Outras	0,00%	0	16,33%	8		
Fatores associados	Tabagismo prévio	11,11%	1	46,94%	23	0,07
	Dislipidemia	11,11%	1	16,33%	8	1,00
	IAM prévio	0,00%	0	16,33%	8	0,33
	Tabagista	11,11%	1	12,24%	6	1,00
	AVC prévio	0,00%	0	8,16%	4	1,00
	Etilismo prévio	0,00%	0	4,08%	2	1,00
	Etilismo	0,00%	0	2,04%	1	1,00
	Tabagismo passivo	0,00%	0	2,04%	1	1,00
Outros	0,00%	0	8,16%	4		

Legenda: HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DM: diabetes melito; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DRC: doença renal crônica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Não houve diferença significativa entre o tempo médio de internação de todos os pacientes, que foi de 9,08 dias ($\pm 6,25$ dias; 1-36), e dos pacientes que não faleceram (9 dias; $\pm 4,87$ dias; 1-36) ($p=0,81$). A taxa de mortalidade em 30 dias foi de 18,37% ($n=9$), sendo que 77,78% ($n=7$) vieram a óbito durante o tempo de permanência no hospital e 22,22% ($n=2$) após alta hospitalar ($p=0,09$). A taxa de mortalidade nos idosos normalmente é alta, sendo frequentemente significativa em relação aos adultos (<65 anos) (KOTHE et al., 2008; OSUNA et al., 2006; RIQUELME et al., 1997; ROYSTED et al., 2015). Todavia, no presente estudo, essa diferença não foi significativa ($p=0,70$), observando-se taxa de mortalidade de 20,69% ($n=6$) nos idosos e 27,27% ($n=3$) nos adultos (<65 anos). Houve necessidade de internação nas UTIs em 12,24% ($n=6$) dos casos, e 83,33% ($n=5$) dos pacientes que necessitaram de UTI vieram a óbito, sendo essa diferença significativa ($p<0,001$). Esse dado aponta a necessidade de UTI em casos mais graves e uma taxa maior de mortalidade nesses pacientes. As comorbidades e fatores associados mais prevalentes nos sobreviventes foram: HAS (55,00%; $n=22$), DPOC (45%; $n=18$), DM (30%; $n=12$) e tabagismo prévio (52,50%; $n=21$); e, nos pacientes que vieram a óbito, foram: DPOC (44,44%; $n=4$), HAS (33,33%; $n=3$) e ICC (33,33%; $n=3$). Não houve diferença a respeito das características (comorbidades e fatores associados), quantidade de comorbidades associadas e a troca de antibiótico durante o tratamento (36,73%; $n=18$) entre os pacientes sobreviventes e os que vieram a óbito ($p>0,05$) (Tabela 8). Porém, Kothe e colaboradores (2008) observaram diferença em relação às comorbidades dos pacientes que vieram a óbito e a troca de antibiótico durante o tratamento foi considerada um fator de risco independente, indicando que, na população deste estudo, a taxa de mortalidade possivelmente esteve relacionada a diferentes fatores.

Tabela 8 - Características dos pacientes que vieram a óbito e pacientes que sobreviveram no presente estudo.

		Sobreviventes		Óbito		P
		%	n	%	n	
Sexo	Masculino	55,00%	22	77,78%	7	0,28
	Feminino	45,00%	18	22,22%	2	0,28
Idade	< 65 anos	27,50%	11	33,33%	3	0,70
	≥ 65 anos	72,50%	29	66,67%	6	0,70
Comorbidades + fatores associados	0	0,00%	0	0,00%	0	
	1	7,50%	3	11,11%	1	
	2	30,00%	12	55,56%	5	
	≥ 3	62,50%	25	33,33%	3	
Comorbidades	HAS	55,00%	22	33,33%	3	0,29
	DPOC	45,00%	18	44,44%	4	1,00
	DM	30,00%	12	22,22%	2	1,00
	ICC	17,50%	7	33,33%	3	0,36
	Hipotireoidismo	10,00%	4	0,00%	0	1,00
	Asma	5,00%	2	0,00%	0	1,00
	DRC	2,50%	1	11,11%	1	0,34
	Fibrose Pulmonar	2,50%	1	11,11%	1	0,34
	Doença de Parkinson	2,50%	1	0,00%	0	1,00
Outras	17,50%	7	11,11%	1		
Fatores associados	Tabagismo prévio	52,50%	21	22,22%	2	0,15
	Dislipidemia	17,50%	7	11,11%	1	1,00
	IAM prévio	17,50%	7	11,11%	1	1,00
	Tabagista	10,00%	4	22,22%	2	0,30
	AVC prévio	5,00%	2	22,22%	2	0,15
	Etilismo prévio	5,00%	2	0,00%	0	1,00
	Etilismo	0,00%	0	11,11%	1	0,18
	Tabagismo passivo	2,50%	1	0,00%	0	1,00
	Outros	10,00%	4	0,00%	0	

Legenda: HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DM: diabetes melito; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DRC: doença renal crônica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A avaliação da gravidade da PAC auxilia o médico na decisão do local de tratamento, intensidade da investigação etiológica e na escolha do tratamento. Os escores de gravidade (PSI e CURB-65) avaliam o risco de mortalidade em 30 dias (CORRÊA et al., 2009). A avaliação do escore CURB-65 foi realizada, neste estudo, com os dados presentes nos

prontuários no dia da admissão hospitalar. Foi observado que, em 63,79% (n=37) dos casos, pelo menos um dado desse escore não foi encontrado (p=0,03); 2,7% (n=1) não continham informações sobre a presença ou ausência de confusão mental, 13,51% (n=5) sobre ureia, 91,89% (n=34) sobre a frequência respiratória e 29,73% (n=11) sobre a pressão arterial. Dentre a ausência das informações, a frequência respiratória foi significativa (p=0,000). É de se surpreender que a frequência respiratória esteja ausente na maior parte dos casos, uma vez que faz parte da avaliação clínica dos pacientes, e a ureia, que necessita de exames laboratoriais, esteja presente na maior parte dos prontuários. A ausência de uma informação foi verificada em 48,27% (n=28) dos casos de PAC, de duas informações em 8,62% (n=5) e de 3 ou mais informações em 6,89% (n=4) dos casos. Dos pacientes tratados ambulatoriamente, 88,89% (n=8) não apresentavam as informações necessárias para a definição do escore CURB-65, enquanto que essa taxa foi de 59,18% (n=29) nos pacientes hospitalizados; todavia essa diferença não foi significativa (p=0,13), ou seja, a ausência de informações não se diferenciou entre pacientes tratados ambulatoriamente e hospitalizados. Esperava-se que essa ausência fosse maior nos pacientes tratados ambulatoriamente, pois o médico precisa avaliar o risco da PAC para a tomada de decisão da internação, e os prontuários completos fornecem informações consistentes e orientam o raciocínio lógico para a tomada desta decisão. A aderência aos guias e normas clínicas pode trazer grande impacto na evolução dos pacientes e no âmbito econômico, auxiliando a reduzir os custos em relação à hospitalização prolongada (CUPURDIJA et al., 2015; SANHUEZA et al., 2009).

A avaliação da gravidade da PAC foi realizada somente nos pacientes em que os dados para o escore CURB-65 estavam completos (36,20%; n=21). Desses pacientes, 42,86% (n=9) obtiveram um escore de até um ponto no CURB-65, sendo prováveis candidatos ao tratamento ambulatorial. Todavia, desses pacientes, apenas um caso foi tratado ambulatoriamente, sendo essa diferença significativa (p=0,01). Relatos semelhantes foram encontrados por Rosón e colaboradores (2001) e Cupurdija e colaboradores (2015), em que uma grande parcela de pacientes foi atribuída a grupos de baixo risco, indicando que a decisão de hospitalização foi baseada em critérios convencionais que não estavam em concordância com a regra preditiva. Deve-se levar em conta que os escores apenas auxiliam na decisão da internação, não se devendo utilizá-los como ferramenta única, ou seja, o julgamento clínico deve sobrepor-se aos escores (CORRÉA et al., 2009; ROSÓN et al.,

2001). Deve-se considerar também que os médicos normalmente superestimam a gravidade da PAC e têm dificuldade para detectar pacientes de risco elevado (SANHUEZA et al., 2009). Neste estudo, 23,81% (n=5) obtiveram escore dois no CURB-65 e 33,33% (n=7) obtiveram escore três, nenhum paciente obteve escore maior ou igual a quatro. Kothe e colaboradores (2008) observaram uma frequência significativamente maior de idosos com escores mais altos; neste estudo, observou-se uma diferença significativa ($p=0,004$) entre os idosos com escores maior ou igual a dois (maior gravidade) em relação aos adultos com escores menor ou igual a um, indicando que a gravidade da PAC esteja possivelmente relacionada com a idade avançada. Uma das limitações do CURB-65 é a ausência da inclusão de doenças associadas, o que pode ter refletido na decisão do clínico pela internação mesmo nos casos menos graves (CURB-65 escore 0 a 1), todavia, em outros estudos realizados, o método preditivo CURB-65 apresentou sensibilidade semelhante ao PSI, que inclui doenças associadas na avaliação do escore (CORRÊA et al., 2009; WESEMANN et al., 2015).

A média do tempo de internação dos pacientes que obtiveram escore 0 – 1 (CURB-65) foi de 10 dias ($\pm 6,16$ dias; 3 – 18), para escore 2 foi de 5 dias ($\pm 1,64$ dias; 3 – 6) e para escore 3 foi de 10 dias ($\pm 4,35$ dias; 2 – 16), no entanto, sem diferença significativa ($p=0,24$). Não houve diferença entre a quantidade de comorbidades do grupo 1 para o 2 ($p=0,28$) e do grupo 2 para o 3 ($p=0,21$), bem como a presença de alguma comorbidade isolada entre os mesmos grupos. Deduz-se que, segundo os dados do presente estudo, a gravidade da PAC não está relacionada com a presença de alguma comorbidade específica, bem como com a quantidade de comorbidades. Em estudo realizado no Irã., os autores descreveram o método CURB-65 como com uma precisão melhor em relação à mortalidade e à necessidade de UTI em comparação com o PSI, sendo os dois métodos úteis para pacientes com baixo risco e um guia para a alta antecipada (ALAVI-MOGHADDAM et al., 2013). Todavia, nesta amostra, não foi observada uma diferença significativa ($p=0,13$) para o tempo de internação entre os pacientes de baixo risco (escore 0-1) e os pacientes com escores mais altos (≥ 2), indicando que o tempo de estadia possa estar relacionado a outras complicações, no caso, a doenças associadas, pois não houve diferença estatística entre os grupos, falha terapêutica ou até mesmo cautela dos clínicos em relação à alta hospitalar, o que foi relatado também por Osuna e colaboradores (2006).

Em um estudo realizado por Alavi-Moghaddam (2013), foi observado um aumento na mortalidade e necessidade de UTI na

presença de escores mais altos, todavia a taxa de mortalidade dos pacientes com escore 0 – 1 foi de 0%, com escore dois foi de 20% (n=1) e com escore três foi de 42,86% (n=3), não havendo diferença entre o grupo com escore dois e o grupo com escore três (p=0,57).

Dos 58 pacientes analisados neste estudo, 15,52% (n=9) fizeram uso de antibiótico prévio e, em 19% (n=11) dos casos, a coleta foi realizada após admissão hospitalar, conseqüentemente, esses pacientes já faziam uso de antibiótico prévio.

Os betalactâmicos com inibidores de betalactamases foram os antibióticos de escolha em 55,56% (n=5) dos casos, as fluoroquinolonas em 33,33% (n=3) e os macrolídeos em 11,11% (n=1), nos pacientes ambulatoriais, sendo que 88,89% foram tratados com monoterapia e 11,11% (n=1) com terapia combinada. Apesar de não haver diferença entre a prescrição de antibióticos que estavam de acordo com as diretrizes (33,33%; n=3) e aqueles que não estavam de acordo (66,67%; n=6) (p=0,31), deve-se lembrar que o uso de betalactâmicos isolados pode levar à falha terapêutica em um a cada 14 pacientes tratados, e o tratamento empírico inicial deve ser feito com base nos principais patógenos (CORRÊA et al., 2009; LIM et al., 2001).

Dos pacientes internados, 16,33% (n=8) fizeram tratamento inicial com um antibiótico e 83,67% (n=41) fizeram terapia inicial combinada, sendo essa diferença significativa (p=0,001). A terapia inicial foi feita, em 89,80% (n=44) dos casos, com betalactâmicos com inibidores de betalactamases; em 81,63% (n=40), com macrolídeos; em 8,16% (n=4), com cefalosporinas e, em 4,08% (n=2), com quinolonas. As diretrizes brasileiras recomendam o uso de terapia combinada nos pacientes internados, o uso de quinolona ou betalactâmico e macrolídeo para os pacientes internados não graves e o uso de antibióticos betalactâmicos e quinolona ou macrolídeo para os pacientes admitidos em UTI (sem risco de *Pseudomonas* sp.). Não há indicações sobre o uso de cefalosporinas, ou seja, um quinto (20,41%; n=10) dos pacientes internados não estavam fazendo o tratamento de acordo com as diretrizes (uso de cefalosporinas e tratamento monoterápico). A troca de antibiótico aconteceu em 36,73% (n=18) dos casos, todavia, após análise dos prontuários, não ficou claro o motivo da troca, deduzindo-se a falha terapêutica, o que comprova a adequação da antibioticoterapia empírica inicial observada em outros estudos (CORRÊA et al., 2001; GLEASON et al., 1999). A inclusão de um macrolídeo na antibioticoterapia combinada é de grande importância, devido à sua eficácia contra agentes típicos e atípicos (OSUNA et al., 2006).

A não aderência às diretrizes brasileiras em relação ao tratamento foi maior nos pacientes ambulatoriais em comparação com os pacientes hospitalizados ($p=0,009$), o que demonstra uma possível falta de assimilação das diretrizes por parte dos médicos do pronto-atendimento, já que a ausência de informações necessárias para o escore CURB-65, coletadas no pronto-atendimento, também foi significativa ($p=0,01$). Esse dado caracteriza a não utilização das diretrizes como instrumentos de auxílio para a tomada de decisões.

O pedido de exames microbiológicos foi realizado em 53,06% ($n=26$) dos pacientes internados, sendo eles: hemocultura (61,54%; $n=16$), urocultura (53,85%; $n=14$), pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) (23,08%; $n=6$), cultura de aspirado traqueal (11,54%; $n=3$), cultura de escarro (7,69%; $n=2$), cultura de lavado broncoalveolar (LBA) (7,69%; $n=2$), cultura de líquido (3,85%; 1) e coloração de Gram para escarro (3,85%; 1). Este estudo demonstra que não foram realizados quaisquer testes microbiológicos em 46,94% ($n=23$) dos pacientes hospitalizados, e, em amostras do trato respiratório (TR), não foram realizadas pesquisas microbiológicas em 83,67% ($n=41$) dos pacientes internados ($p=0,001$). A detecção de um agente etiológico foi possível em 23,08% ($n=6$) dos casos em que a cultura foi solicitada, sendo dois por hemocultura (33,33%), dois em LBA (33,33%), um em líquido (16,67%) e um em aspirado traqueal (16,67%). A falha do diagnóstico microbiológico pode ser devido ao tratamento prévio nos pacientes em que foram coletadas, pois 37,93% ($n=11$) das amostras foram obtidas após o primeiro dia do início do tratamento. Sabe-se também que hemoculturas realizadas em até 24 horas após a admissão hospitalar mostram-se associadas à melhora na sobrevivência em 30 dias em pacientes hospitalizados por PAC (FINE et al., 1999). Neste levantamento, observou-se a realização de hemoculturas em somente 32,65% ($n=16$) dos casos, identificando-se uma área em que a melhoria dos procedimentos é necessária com vistas ao cuidado da saúde dos pacientes. O Quadro 3 apresenta o microrganismo isolado e o tipo de amostra utilizada.

Quadro 3 – Microrganismos isolados nos pacientes deste estudo com PAC, de acordo com o exame solicitado.

Paciente	Exame	Microrganismo	Exame	Microrganismo
PN-008	Hemocultura	<i>P. aeruginosa</i>		
PN-013	LBA	<i>P. aeruginosa</i>		
PN-020	Líquor	<i>S. pneumoniae</i>	Aspirado traqueal	<i>P. aeruginosa</i>
PN-032	Hemocultura	<i>S. pneumoniae</i>		
PN-053	Aspirado traqueal	<i>Candida albicans</i>		
PN-056	LBA	<i>Candida</i> sp e <i>Haemophilus</i> sp.		

Legenda: LBA: Lavado broncoalveolar; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Dentre os pacientes em que algum microrganismo foi isolado, apenas dois tiveram amostra coletada após o início prévio de antibióticos (PN-013 e PN-020). Em quatro casos, houve troca de antimicrobianos, sendo três em virtude do microrganismo isolado, e em um paciente a troca do antibiótico não ficou clara, pois o microrganismo isolado foi um fungo (*Candida albicans*) e o tratamento prescrito foi um antibiótico (piperacilina + tazobactam). Entre os casos em que não houve troca do tratamento (n=2), um paciente faleceu antes do resultado do teste microbiológico e o outro respondeu positivamente ao tratamento inicial.

A diretriz brasileira preconiza o pedido de hemocultura, bacterioscopia e cultura de escarro, antígeno urinário para pneumococo e *Legionella* sp. e cultura de LBA ou aspirado traqueal nos pacientes que foram admitidos em UTI ou com PAC grave e nos pacientes com falha de tratamento clínico. Todavia, no presente estudo, a ausência de pelo menos um desses exames foi observada em todos (100%; n=24) os casos, se considerarmos os pacientes em que a troca de antibiótico está relacionada à falha terapêutica. Nos pacientes admitidos na UTI, a hemocultura foi realizada em 100% (n=6) dos casos e a cultura de LBA ou aspirado traqueal em 33,33% (n=2); não foi realizado nenhum exame de bacterioscopia e cultura de escarro ou pesquisa de antígenos urinários. Nos pacientes com suposta falha terapêutica (37,73%; n=18) (pacientes em que houve troca de antibiótico), a hemocultura foi solicitada em 50% (n=9) dos casos, a cultura de escarro em 11,11% (n=2), sendo que somente em um dos casos a bacterioscopia foi

solicitada, a cultura de LBA ou de aspirado traqueal em 16,67% (n=3) e não foi solicitada a pesquisa de antígenos urinários.

Nos pacientes com cavitação e estílicas, os exames preconizados são a hemocultura e a bacterioscopia, e a cultura de escarro. Nesses pacientes, pelo menos um dos exames não foi solicitado pelos médicos. A hemocultura foi solicitada em 66,66% (n=3) dos casos e a bacterioscopia e cultura de escarro não foi solicitada em nenhum destes pacientes. Como visto anteriormente, a falta de adesão dos médicos às diretrizes é um fato recorrente, tanto na prescrição de medicamentos quanto na necessidade de avaliação do risco de gravidade da PAC e solicitações de exames. A cultura para a aderência às normas deve ser incentivada, o médico precisa estar seguro das decisões referentes à necessidade de internação, à prescrição de antibióticos e solicitação de exames e manejo desses pacientes, justificando a sua conduta.

5.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Assim como em qualquer estudo, a presente pesquisa apresentou limitações. Inicialmente, por ter sido realizada somente em um hospital da região e por apresentar uma quantidade menor das amostras necessárias para significância, o que pode não refletir todo o espectro da população. Além disso, os dados analisados em relação às doenças de base foram retirados dos prontuários; visto que as informações necessárias para a escala CURB-65 estavam ausentes na maior parte dos casos, não há como precisar 100% das informações. Acrescenta-se a essa situação a inexatidão em relação à mortalidade em 30 dias da PAC; como a pesquisa limitou-se ao âmbito hospitalar, não foi possível o acompanhamento do paciente em casos de internação em outro hospital ou clínica, ou ainda, em casos de óbito ocorrido nas esferas familiar e residencial.

5.3 PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae* E *H. influenzae*

A PCR é uma técnica de amplificação de DNA *in vitro* que pode apresentar alta sensibilidade e especificidade se tanto a qualidade do DNA a ser amplificado quanto a escolha dos iniciadores forem adequadas (ABD-ELSALAM, 2003; PATEL; VIRANI, 2013; SINGH; KUMAR, 2001). Por isso, esses dois parâmetros receberam atenção especial nesta etapa do trabalho.

5.3.1 Extração e purificação do DNA

A preparação das amostras é um passo fundamental para garantir a eficiência nas reações de PCR. A extração deve ser eficiente para que o DNA esteja puro, intacto e em concentração suficiente para que as reações de PCR ocorram. Caso a recuperação de DNA seja baixa e haja excesso de inibidores da amplificação, o resultado pode ser uma baixa eficiência de reação e, conseqüentemente um grande número de resultados falsos negativos (GREENFIELD; WHITE, 1993).

A determinação da quantidade de DNA e da pureza da amostra foi realizada por espectrofotometria (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; TEARE et al., 1997), em que a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional à concentração de proteínas ou ácidos nucleicos em uma amostra (TEARE et al., 1997). O pico de absorbância das moléculas de DNA e RNA é em 260 nm, enquanto a maioria das proteínas absorvem a 280 nm; assim, a relação entre A_{260}/A_{280} fornece a principal informação sobre a pureza da amostra. Valores entre 1,7 e 2,2 da relação A_{260}/A_{280} indicam amostras puras; relações mais baixas indicam presença de proteínas e mais altas extrapolam a linearidade do método (TEARE et al., 1997).

Neste estudo foram avaliados três métodos de extração e purificação do DNA, o resultado da quantificação de algumas amostras (raspado de orofaringe) de paciente saudável (sem comorbidades ou doença respiratória crônica) e da relação entre A_{260}/A_{280} é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentração de DNA e relação A_{260}/A_{280} de amostras de paciente saudável em relação à metodologia empregada.

Swabs de orofaringe	Método automatizado		Kit de extração		Método <i>Salting-out</i>	
	[] (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	[] (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	[] (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
1	21	2,11	3,4	1,12	9,7	1,5
2	25	0,77	12,7	1,68	13,5	1,14
3	53	1,43	20,5	1,6	7,6	1,34
4	30,5	0,81	4,5	1,18	18,5	1,33
5	38	1,85	4,4	1,52	10	1,24
6	35,5	1,82	5,5	1,47	15,2	1,31
7	42	1,79	5,5	1,62	7,3	1,13
8	129,5	1,47	5,2	1,45	5,2	0,87
Média	46,81	1,51	7,71	1,46	10,88	1,23
Desvio padrão	34,87	0,49	5,91	0,2	4,5	0,19

Legenda: []: concentração. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A avaliação da qualidade e quantidade de DNA por espectrofotometria é rápida, barata e de fácil acesso à maioria dos laboratórios; entretanto, apresenta limitações por não diferenciar moléculas de DNA dupla ou simples fita e de RNA, tendendo a superestimar a concentração de ácidos nucleicos nas amostras. Apesar disso, pode-se fazer uma análise comparativa entre os valores médios obtidos com os três métodos de extração. Foi possível observar que o método de extração automatizada apresentou melhores resultados em relação à concentração de DNA extraído em comparação ao kit ($p=0,008$) e ao método de *Salting-out* ($p=0,01$). O método automatizado também apresentou melhor resultado em relação à pureza das amostras, todavia, sem diferença estatística em comparação ao kit ($p=0,40$) e ao método *Salting-out* ($p=0,07$). O método de extração automatizado possui outras vantagens, como a rapidez, levando em média 3 horas para extração e purificação de até 96 amostras ao mesmo tempo, se comparado com o método *Salting-out*, que leva em média 24 horas e necessita de uma quantidade maior de amostra. Tendo em vista tais resultados, o método de extração automatizada foi escolhido para a extração das amostras dos pacientes com pneumonia.

5.3.2 Desenho e avaliação de iniciadores para detecção de *M. pneumoniae*

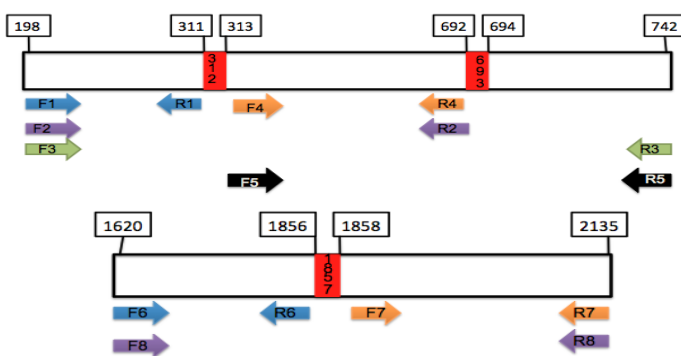
5.3.2.1 Desenho de novos iniciadores

Considerando o grande avanço na área genômica nas últimas décadas e o fato de que os iniciadores mais usados na literatura para detecção de *M. pneumoniae* por PCR foram descritos em 1993 (DE BARBEYRAC et al., 1993), um dos objetivos do presente trabalho foi desenhar novos iniciadores com base em todas as sequências do gene-alvo depositadas nos bancos de dados públicos.

Assim, a pesquisa na base de dados *Genbank* forneceu 35 sequências do gene da proteína de citoadesina P1, compreendendo 15 sequências completas e 20 sequências parciais, as quais foram importadas no formato *Fasta* para serem alinhadas no programa BioEdit (HALL, 1999), pela ferramenta Clustal W.

A sequência “***Mycoplasma pneumoniae* P1 Cytadhesin (P1) gene, complete cds. Genbank: AF286371.1**” foi escolhida como referência. Após o alinhamento, foram observadas regiões conservadas entre 198 pb e 742 pb e entre 1.620 pb e 2.135 pb, com a presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) nas posições 313 pb, 693 pb e 1.857 pb. A Figura 12 indica as regiões conservadas que foram avaliadas no desenho dos iniciadores.

Figura 12 – Regiões conservadas do gene da proteína de citoadesina P1 de *M. pneumoniae* avaliadas para o desenho de iniciadores específicos.



Legenda: Em vermelho os SNPs, em branco a sequência-alvo conservada e as setas indicam as posições dos iniciadores; F: iniciador senso; R: iniciador antissenso. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Os iniciadores foram desenhados e avaliados pelo programa Primer Select do pacote DNA Star (Lasergene), considerando os seguintes critérios para a seleção do melhor par (ABD-ELSALAM, 2003; CHUANG; CHENG; YANG, 2013; DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993; GREENFIELD; WHITE, 1993; KOVACIC; GRAU; BLANCHARD, 1996; PATEL; VIRANI, 2013; SINGH; KUMAR, 2001):

- tamanho de produto entre 100 pb e 400 pb para a detecção de patógenos em amostras clínicas por PCR de ponto final;
- iniciadores com tamanho entre 18 pb e 24 pb, para garantir especificidade das sequências;
- composição dos iniciadores entre 40% e 60% de bases G+C para que a temperatura de fusão (*melting*) (T_m) seja entre 56°C a 62°C;
- diferença de temperaturas de fusão (dT_m) entre os iniciadores do par de até 3°C, o que garante uma janela térmica para uma ligação eficiente e maior chance de manter a especificidade;
- evitar sequências complementares na porção 3', região de maior impacto na especificidade de ligação dos iniciadores;
- inclusão de até 3 bases G/C nos cinco últimos nucleotídeos da porção 3', o que fornece mais pontes de hidrogênio à ligação e garante maior força de ligação dos iniciadores à sequência;
- minimizar regiões complementares nos iniciadores para reduzir a formação de dímeros e grampos (*hairpins*). A energia tolerável para formação de dímeros intra e interiniciadores (ΔG) é de -5 kcal/mol na porção 3' e -6 kcal/mol na região interna. Para formação de grampos (*hairpins*), a energia tolerável é de -2 kcal/mol na porção 3' e -3 kcal/mol para grampos internos. A estabilidade de grampos (*hairpins*) ou dímeros é representada pelo ΔG , que é a medida da espontaneidade da reação (Energia Livre de Gibbs). Valores altos de ΔG indicam grampos ou dímeros indesejados. Grampos ou *hairpins* são formados por interações intramoleculares dentro do iniciador, resultando em produtos inespecíficos com tamanho de banda inferior a 100 pb.

Considerando o exposto acima e a avaliação da especificidade pela ferramenta Primer Blast (NCBI), o melhor par de iniciadores é complementar às posições 1667 até 1688 (senso) e 2001 até 2024 (antissenso), e resulta em um produto de 358 pb:

LMP1 (senso): 5' - ACACCGCGCCTTTGAGTATAGG - 3'

LMP1 (antissenso): 5' - CATCCGTAGGGTGTGAAGAGTTGC - 3'

5.3.2.2 Avaliação *in silico* dos iniciadores descritos anteriormente e dos iniciadores desenhados neste estudo

Além de obter iniciadores mais atualizados, considerando as sequências depositadas no *GenBank* após o trabalho de Barbeyrac et al. (1993), o desenho de novos iniciadores teve o objetivo de obter sequências com características melhores e que garantissem maior sensibilidade e especificidade em relação aos iniciadores mais utilizados na literatura.

Ambos os iniciadores descritos anteriormente (DE BARBEYRAC et al., 1993), MP-P11 senso (5' - TGCCATCAACCCGCGCTTAAC - 3') e MP-P12 antissenso (5' - CCTTTGCAACTGCTCATAGTA - 3'), apresentaram tamanho de 21 pb e T_m de 61,6°C (G+C = 57,1%) e de 47,6°C (G+C = 42,9%) respectivamente. A análise do par mostrou 6 dímeros possíveis no iniciador senso, 8 dímeros no antissenso e 11 dímeros interiniciadores, sendo que o pior deles apresentava ΔG de -10.4 kcal/mol, -2.9 kcal/mol e -3.1 kcal/mol, respectivamente. Quatro grampos foram encontrados para o iniciador senso e cinco para o iniciador antissenso, em que o pior dos casos apresentava ΔG de 1,1 kcal/mol e 1,4 kcal/mol, respectivamente.

Após análise dos iniciadores, pode-se observar que alguns parâmetros não estavam de acordo com a literatura. A quantidade de G+C nos oligonucleotídeos era extremamente diferente, e, conseqüentemente, também a dT_m (14°C). Assim, como a temperatura de ligação dos iniciadores na PCR é baseada no iniciador de menor T_m , o iniciador com a maior T_m pode ligar-se inespecificamente, resultando em produtos indesejados e diminuindo a eficiência da PCR (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993). Outro fator que chama atenção é a chance de ocorrer espontaneamente a formação de um dímero no iniciador senso (ΔG de -10,4 kcal/mol), sendo que a literatura recomenda ΔG de até -6 kcal/mol (PATEL; VIRANI, 2013).

A análise da especificidade pela ferramenta Primer Blast (NCBI) também forneceu dados importantes. Os iniciadores apresentaram produtos de tamanhos diferentes na sequência-alvo (AF286371.1), todavia com uma diferença de apenas 4 pb. Em algumas sequências (23/46) de *M. pneumoniae*, observou-se um *mismatch* de dois

nucleotídeos, porém os mesmos se encontravam na porção 5', onde *mismatches* são aceitáveis por não interferirem na ligação inicial do iniciador à sequência-alvo (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993).

Já os iniciadores LMP1 (senso): 5' - ACACCGCGCCTTTGAGTATAGG - 3' e LMP1 (antissenso): 5' - CATCCGTAGGGTGTGAAGAGTTGC - 3', que foram desenhados neste estudo, apresentaram tamanho de 22 pb e 24 pb, T_m de 57.1°C (G+C = 54,5%) e 58.6°C (G+C = 54,2%), respectivamente, com uma dT_m de somente 1,5°C. Foram encontrados 6 dímeros possíveis para o iniciador senso, 4 para o iniciador antissenso e 9 para dímeros interiniciadores, com maiores ΔG de -3.4 kcal/mol, -3.1 kcal/mol e -3.1 kcal/mol, respectivamente. Os iniciadores apresentaram 5 e 7 possíveis grampos, com ΔG de -0.2 kcal/mol e 1.4 kcal/mol para o iniciador senso e antissenso, respectivamente. Pode-se observar também a presença de grampos G/C na porção 3', sem exceder 3 desses nucleotídeos, garantindo uma força de anelamento maior na porção específica do iniciador. Assim, todas as características *in silico* dos iniciadores estão de acordo com a literatura.

A análise dos iniciadores feita com a ferramenta Primer Blast (NCBI) garantiu a especificidade *in silico*. Foi observado que todas as sequências encontradas apresentavam o tamanho de produto desejado (358 pb), nenhum *mismatch* foi encontrado, bem como os iniciadores reconheceram somente sequências de *M. pneumoniae*.

O Quadro 4 apresenta as características dos iniciadores descritos anteriormente (DE BARBEYRAC et al., 1993), iniciadores desenhados neste estudo e dos valores preconizados pela literatura.

Quadro 4 – Características dos iniciadores utilizados para a detecção de *M. pneumoniae*.

Características	Parâmetros desejáveis	DE BARBEYRAC et al. (1993)		Este estudo	
		Senso	Antissenso	Senso	Antissenso
Tamanho	18 – 24 pb	21 pb	21 pb	22 pb	24 pb
T_m (fusão)	56 – 62°C	61,6°C	47,6°C	57,1°C	58,6°C
dT_m	< 3°C	14°C		1,5°C	
G+C	40 – 60%	57,1%	42,9%	54,5%	58,6%
G/C na porção 3'	Máx. 3 pb	1 pb	1 pb	2 pb	3 pb
Dímeros intra na porção 3'	ΔG -5 kcal/mol	- 10,4 kcal/mol	- 2,9 kcal/mol	- 3,4 kcal/mol	- 3,1 kcal/mol
Dímeros intra internos	ΔG -6 kcal/mol				
Dímeros inter na porção 3'	ΔG -5 kcal/mol	- 3,1 kcal/mol		- 3,1 kcal/mol	
Dímeros inter internos	ΔG -6 kcal/mol				
Grampos na porção 3'	ΔG -2 kcal/mol	1,1 kcal/mol	1,4 kcal/mol	- 0,2 kcal/mol	1.4 kcal/mol
Grampos internos	ΔG -3 kcal/mol				

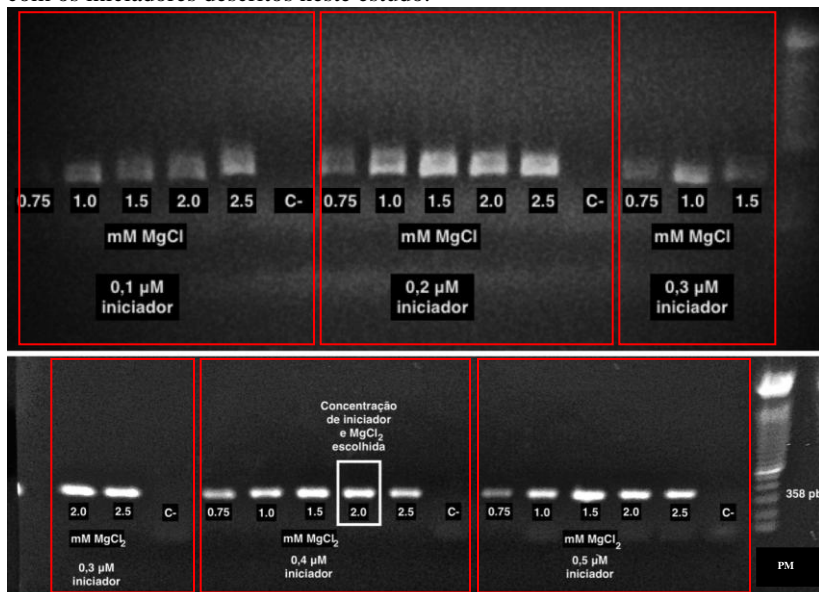
Legenda: Em verde, características de acordo com a literatura e, em vermelho, características não desejadas. Fonte: Desenvolvido pela autora.

5.3.3 Padronização da PCR para os iniciadores desenhados neste estudo

A padronização da PCR para *M. pneumoniae* foi realizada de acordo com a Tabela 2, onde a concentração de $MgCl_2$ e iniciadores foram variáveis e a concentração de tampão (1x), dNTPs (200 μM de cada) e Taq DNA polimerase (1U) foram iguais em todas as reações; a reação foi feita com volume final de 10 μL . A Figura 13 apresenta os resultados e pode-se observar o aparecimento de uma banda entre 300 pb e 400 pb do padrão de tamanho molecular, a qual está de acordo com o produto esperado, que é de 358 pb. A concentração do iniciador em que foi possível observar uma amplificação de melhor intensidade foi de 0,4 μM e concentração de 2,0 mM de $MgCl_2$; devido a esse fato, essas

concentrações foram escolhidas para serem utilizadas no método de diagnóstico.

Figura 13 – Gel de agarose representativo da padronização da reação de PCR com os iniciadores descritos neste estudo.



Legenda: C-: controle negativo. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA). Gel de agarose representativo da amplificação do fragmento de 358 pb da reação de PCR com diferentes concentrações de iniciadores e $MgCl_2$, utilizada para a padronização da detecção do DNA da cepa M129 de *M. pneumoniae*. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Após a padronização, a PCR para *M. pneumoniae*, utilizando os iniciadores descritos neste estudo, foi realizada em volume final de 10 μL , de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 – Concentrações de reagentes utilizados para PCR de *M. pneumoniae* com os iniciadores desenhados neste estudo.

	Tampão de reação	$MgCl_2$ (25 mM)	Iniciadores	dNTPs (100 mM)	Taq
Concentração	1x	2,0 mM	0,4 μM	200 μM cada	1,0 U
μL	1	0,8	0,4	0,08	0,2

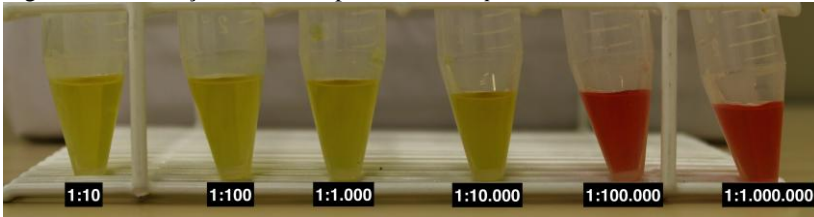
Fonte: Desenvolvido pela autora.

5.3.4 Teste de sensibilidade dos iniciadores para *M. pneumoniae*

O teste de sensibilidade foi realizado em duplicata para ambos os iniciadores e visa mimetizar concentrações decrescentes da bactéria em uma amostra biológica com a presença de inibidores e outros contaminantes.

A determinação da quantidade de bactérias é feita através de uma titulação, em que concentrações decrescentes da cultura positiva são inoculadas no meio de cultura (Figura 8). Assim, o último tubo em que o crescimento é observado (alteração da cor vermelha do meio para amarelo) é considerado 1 CCU/mL, ou seja, uma unidade de mudança de cor que compreende de 10 a 100 células de *M. pneumoniae* (LOENS et al., 2002). A Figura 14 mostra o resultado da titulação, onde se observa crescimento até a diluição 10^4 , ou seja, a cultura inicial utilizada para inocular no raspado de orofaringe do paciente saudável possuía 10.000 CCU/mL.

Figura 14 – Titulação da cultura positiva de *M. pneumoniae* M129.



Legenda: Em amarelo, as culturas em que houve o crescimento de *M. pneumoniae* M129 e, em vermelho, as culturas negativas. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A sensibilidade da PCR é apresentada na Figura 15, onde se observa que o iniciador descrito anteriormente foi sensível até a diluição 10^{-1} , enquanto o iniciador desenhado neste estudo foi sensível até a diluição 10^{-2} . Assim, a sensibilidade dos iniciadores descritos anteriormente foi de 5 CCU, estando de acordo com o artigo, em que os autores obtiveram uma sensibilidade de 10 CCU na época (DE BARBEYRAC et al., 1993). A sensibilidade dos iniciadores descritos neste estudo foi de 0,5 CCU, ou seja, 10 vezes mais sensível do que os iniciadores descritos anteriormente.

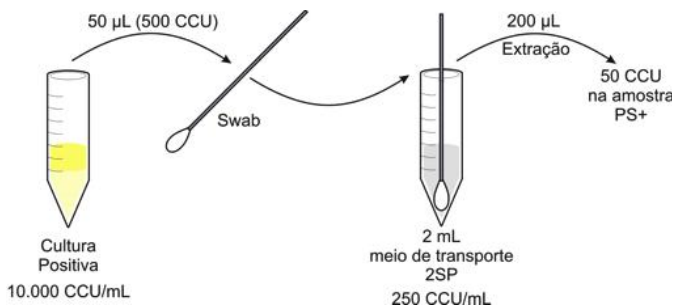
Figura 15 - Gel de agarose representativo do teste da sensibilidade dos iniciadores descritos anteriormente e desenhados neste estudo.



Legenda: C+: controle positivo (DNA da cepa M129 de *M. pneumoniae*); C-: controle negativo; +: amostra +; 10^{-1} : amostra PS1; 10^{-2} : amostra PS2; 10^{-3} : amostra PS3; 10^{-4} : amostra PS4. Gel de agarose representativo da amplificação do gene de citoadesina P1 com os iniciadores descritos anteriormente (466 pb) e desenhados neste estudo (358 pb). Observada reação positiva até a diluição 10^{-1} nos iniciadores descritos anteriormente e 10^{-2} nos iniciadores desenhados neste estudo. Fonte: Desenvolvido pela autora.

O cálculo realizado para obtermos a quantidade de CCU foi feito da seguinte forma: como a cultura inicial apresentava 10.000 CCU/mL, retirou-se 50 μ L para inocular na amostra de orofaringe, ou seja, 500 CCU. Esses 500 CCU foram diluídos em 2 mL do meio de transporte 2SP, resultando em 250 CCU/mL. Desses 2 mL, 200 μ L foram retirados para extração, resultando em 50 CCU na amostra PS+ (Figura 16). Os iniciadores descritos anteriormente (DE BARBEYRAC et al., 1993) obtiveram sensibilidade até a diluição 1:10, a quantidade detectada foi de 5 CCU. A detecção dos iniciadores desenhados neste estudo foi de 0,5 CCU, pois o método apresentou sensibilidade até a diluição 1:100.

Figura 16 – Esquema representativo da quantidade CCU na amostra PS+.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

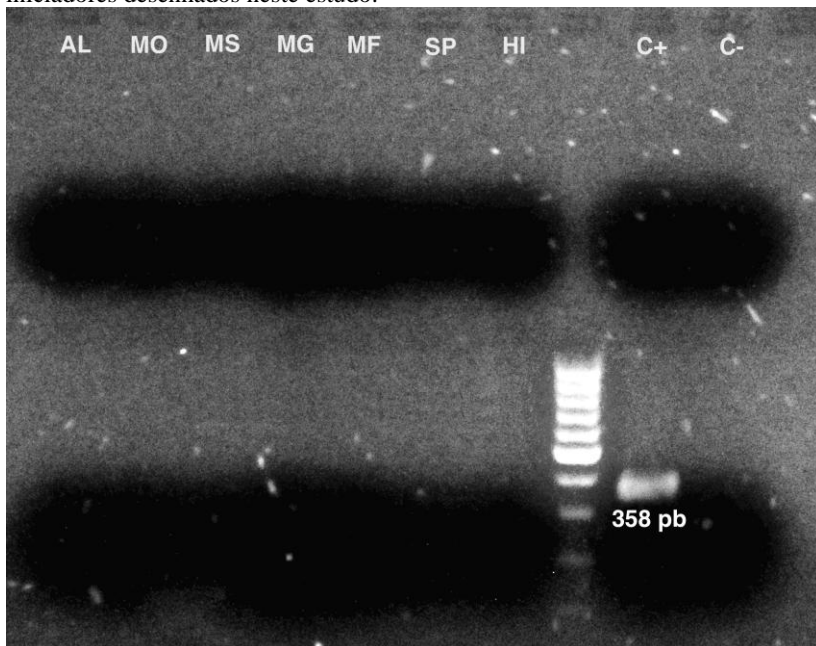
A sensibilidade 10 vezes maior dos iniciadores desenhados neste estudo pode ser explicada pelas características *in silico* que estavam de acordo com a literatura. A grande diferença da temperatura de ligação entre os iniciadores do par pode explicar a menor sensibilidade, uma vez que não foram observados dímeros no gel (fragmentos inespecíficos com menos de 100 pb).

5.3.5 Teste de especificidade *in vitro* dos iniciadores desenhados

O teste de especificidade foi realizado utilizando as bactérias: *Acholeplasma laidlawii* PG8, *Mycoplasma orale* CH19299, *Mycoplasma salivarium* PG20, *Mycoplasma fermentans* IPS8, *Streptococcus pneumoniae* SI15 e *Haemophilus influenzae* SI15, que são frequentemente encontradas como comensais da orofaringe e *Mycoplasma genitalium* ATCC 33530, que é geneticamente relacionado ao *M. pneumoniae* (DE BARBEYRAC et al., 1993; WAITES; TALKINGTON, 2004).

O resultado da especificidade (Figura 17) está de acordo com os resultados encontrados *in silico*, nos quais se observa somente a presença de DNA amplificado no controle positivo da reação (*M. pneumoniae*) e ausência de quaisquer bandas nas amostras de DNA das bactérias utilizadas para especificidade.

Figura 17 - Gel representativo da PCR para o teste de especificidade para os iniciadores desenhados neste estudo.

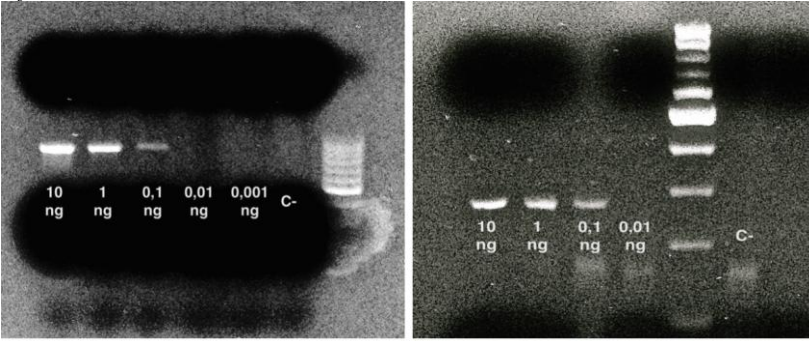


Legenda: AL: *Acholeplasma laidlawii* PG8; MO: *M. orale* CH19299; MS: *M. salivarium* PG20; MG: *M. genitalium* ATCC 33530; MF: *M. fermentans* IPS8; SP: *S. pneumoniae* SI15; HI: *H. influenzae* SI15; C+: controle positivo (DNA da cepa M129 de *M. pneumoniae*); C-: controle negativo. Teste de especificidade dos iniciadores desenhados neste estudo, observando-se fragmento de 358 pb, referente ao gene de citoadesina P1 de *M. pneumoniae* somente no controle positivo. Fonte: Desenvolvido pela autora.

5.3.6 Limite de detecção de *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

Os iniciadores para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* apresentaram a mesma sensibilidade, de 0,1 ng de DNA, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Gel representativo do limite de detecção para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.



Legenda: Gel representativo da amplificação do fragmento de 844 pb do gene da lipoproteína do sistema de transporte de ferro ABC (*piaA*) com concentrações decrescentes de *S. pneumoniae* SI15 (à esquerda). Gel representativo da amplificação do fragmento de 269 pb do gene da proteína externa P6 (*ompP6*) com concentrações decrescentes de *H. influenzae* SI15. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A escolha do gene da lipoproteína do sistema de transporte de ferro ABC (*piaA*) como alvo, por ser exclusiva, foi essencial para o diagnóstico de *S. pneumoniae*, uma vez que muitos iniciadores descritos na literatura para detecção dessa bactéria detectam outros estreptococos, como o *S. mitis* e *S. oralis*, que fazem parte da biota normal da orofaringe (MURDOCH et al., 2003; WHALAN et al., 2006).

Em outros estudos realizados com amostras não invasivas para a detecção etiológica da pneumonia, considerou-se a bactéria detectada como patogênica quando encontrada em uma quantidade $\geq 10^5$ UFC/mL (HOLTER et al., 2015; KAIS et al., 2006; KALIN; LINDBERG, 1983). Em estudo realizado por KAIS e colaboradores (2006), a quantidade de DNA referente a $\geq 10^5$ UFC/mL de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* é de 0,04 ng/ μ L e 0,1 ng/ μ L, respectivamente (KAIS et al., 2006). Assim, devido ao limite de detecção encontrado com os iniciadores, neste estudo (Figura 18), a presença de bandas específicas para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* após PCR foi considerada como provável infecção pelo respectivo microrganismo.

5.4 AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS BACTERIANOS NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM PAC

5.4.1 Prevalência de *M. pneumoniae*

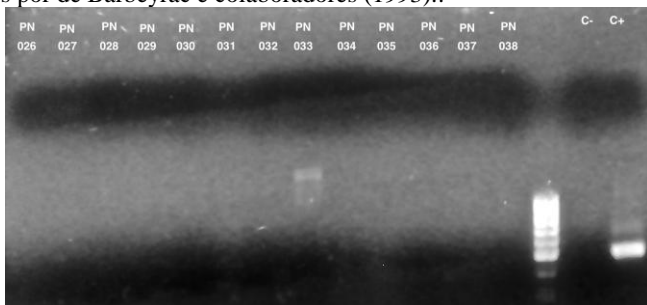
A avaliação da prevalência de *M. pneumoniae* pelos métodos de cultivo e por PCR foi realizada nas 58 amostras de raspado de orofaringe dos pacientes com PAC e por métodos sorológicos em 55 casos, devido à ausência de coleta de amostra de sangue em 3 casos.

A cultura de *M. pneumoniae* é difícil e demorada, pode levar até quatro semanas, e os meios precisam ser enriquecidos para viabilizar o crescimento dessa bactéria (BÉBÉAR, 2007; MANDELL, 2004; SHARP; ROBINSON; SAUBOLLE, 2004). Nos 58 pacientes, não foi observada a alteração de cor vermelha para amarela (Figura 7), indicando ausência de crescimento. Tal resultado não surpreende, devido à sua baixa sensibilidade, entre 23% a 68%, relatada por outros estudos (KENNY et al., 1990; QASEM et al., 2002; SHE et al., 2010; SKAKNI et al., 1992; WARING et al., 2001). Esse método é considerado por Kraft e colaboradores (1998) menos sensível para a detecção de *M. pneumoniae*.

Os métodos moleculares, como a PCR, são considerados mais específicos e podem duplicar a taxa de detecção se comparados com os testes sorológicos e de cultura (BÉBÉAR, 2007; LIM et al., 2009; WAITES; TALKINGTON, 2004; WARING et al., 2001). Partes conservadas do gene da proteína P1 de citoadesina são normalmente utilizados (WAITES; TALKINGTON, 2004), como foi o caso deste estudo. Realizou-se duas reações de PCR, uma com os iniciadores descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993) e outra com os iniciadores descritos neste estudo. O resultado foi dado como positivo quando houve amplificação em pelo menos uma das reações.

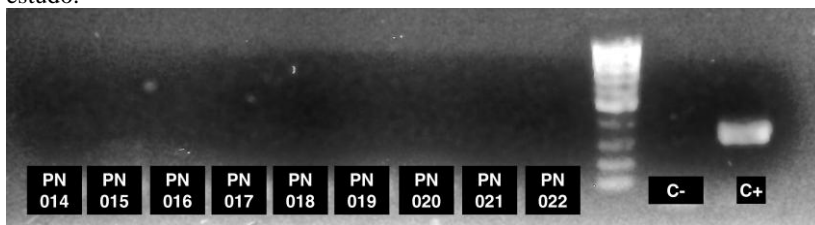
Após a realização das reações de PCR nas 58 amostras de raspado de orofaringe de pacientes com PAC, observou-se a ausência de amplificação em todos os pacientes, utilizando o iniciador descrito anteriormente. Todavia, foi observada a amplificação de um produto inespecífico, acima de 1.500 pb, em um dos pacientes (paciente PN-033), como pode ser observado na Figura 19. Uma amplificação de PCR bem sucedida deve exibir uma única banda com o tamanho esperado e sem bandas inespecíficas (BARTLETT et al., 2003).

Figura 19 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de *M. pneumoniae* em pacientes com PAC deste estudo, utilizando os iniciadores descritos por de Barbeyrac e colaboradores (1993)..



Legenda: C-: controle negativo; C+: controle positivo; PN: paciente com PAC e número do paciente. Observando fragmento de 466 pb no controle positivo e fragmento de produto inespecífico no paciente PN-033, acima de 1.500 pb. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Figura 20 - Foto representativa da reação de PCR para detecção de *M. pneumoniae* em pacientes com PAC, utilizando os iniciadores desenhados neste estudo.



Legenda: PN: pacientes com PAC e número do paciente; C-: controle negativo; C+: controle positivo. Foto representativa da reação de PCR para *M. pneumoniae* em amostras de raspado de orofaringe de pacientes com PAC, utilizando os iniciadores desenhados neste estudo, observando fragmento de 358 pb somente no controle positivo. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Apesar de apresentar uma sensibilidade melhor, comparada aos iniciadores descritos anteriormente (DE BARBEYRAC et al., 1993), das 58 amostras de raspado de orofaringe de pacientes com PAC, nenhuma apresentou amplificação para o gene de aderência da proteína P1, como pode ser observado na Figura 20. Todavia, em nenhum dos casos foi observada a presença de bandas inespecíficas.

A ausência de amplificação em ambos os pares de iniciadores pode realmente refletir amostras negativas para este patógeno ou ser influência do tipo de amostra utilizada. Rätty, Rönkkö e Kleemola (2004)

relataram que o tipo de amostra é crucial para a detecção de *M. pneumoniae*, sendo que o escarro (67%) e aspirados nasofaríngeos (50%) apresentam melhores taxas de positividade em comparação aos raspados de orofaringe (37,5%) (RÄTY; RÖNKKÖ; KLEEMOLA, 2005).

A detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para *M. pneumoniae* foi realizada pelo método de ELISA, utilizando um kit que detecta anticorpos contra a proteína de adesão P1, a qual apresenta melhor relação sensibilidade e especificidade (VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007).

As 55 amostras do soro dos pacientes apresentaram resultados negativos para os anticorpos IgM específicos para *M. pneumoniae*. A presença de anticorpos IgM é prova suficiente para a infecção por *M. pneumoniae*, dispensando a realização da segunda coleta para observar o aumento dos títulos de IgG (soro convalescente). Os anticorpos IgM estão presente na primeira semana após início dos sintomas, enquanto os anticorpos IgG têm aumento gradual durante o curso da doença, tendo pico após cinco semanas (BÉBÉAR, 2007; RODRIGUES; SILVA FILHO; BUSH, 2002; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007; WAITES et al., 2001). Apesar dos títulos altos de anticorpos IgM apresentarem evidência de infecção aguda (WAITES; TALKINGTON, 2004), em infecções de repetição, a resposta de anticorpos IgM está ausente, sendo necessária a segunda coleta na fase convalescente para confirmação de infecção pela observação da elevação do título de anticorpos IgG (BÉBÉAR, 2007; WAITES et al., 2001). Assim, a ausência de anticorpos IgM nos pacientes deste estudo não exclui infecção aguda.

Das 55 amostras coletadas no presente estudo, 56,36% (n=31) apresentaram resultado negativo para os anticorpos IgG, 23,64% (n=13) foram positivas e 20% (n=11) foram inconclusivos ou *borderlines* (zona cinza). Apesar de apresentarem resultados positivos para os anticorpos IgG, uma segunda coleta seria necessária para a observação de aumento de títulos, caracterizando infecção por *M. pneumoniae*; todavia, somente a coleta na fase aguda foi realizada. Tais resultados apenas nos sugerem que, apesar da impossibilidade de caracterização da infecção aguda por *M. pneumoniae* pela metodologia de ELISA, tal microrganismo se apresenta circulante na população do estudo, pois os anticorpos IgG podem perdurar por meses e até anos após infecção aguda (VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007).

Analisando os resultados de todas as metodologias empregadas, podemos sugerir a ausência de PAC por *M. pneumoniae* na população

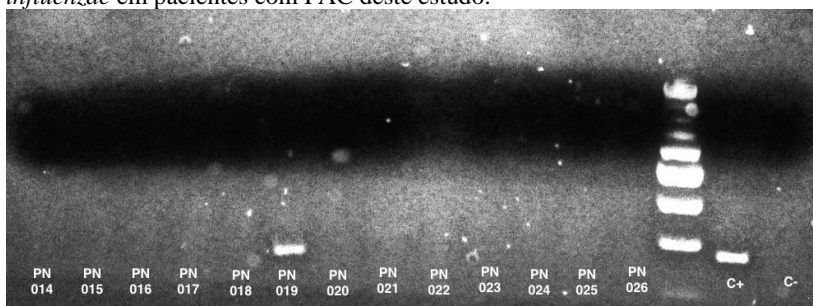
em que o estudo foi realizado. Tais resultados não surpreendem, uma vez que a incidência de *M. pneumoniae* é maior em jovens de 5 a 20 anos tratados ambulatoriamente (DENNY; CLYDE; GLEZEN, 1971; LIU; DASARAJU; LIU, 1996; MANDELL, 2004), e a população deste estudo era, na sua maior parte, composta por idosos e pacientes que necessitaram de hospitalização. Outros estudos corroboram os resultados encontrados, relatando uma prevalência de 2 a 4% em adultos (HOLTER et al., 2015; LIM et al., 2001; RIQUELME et al., 1997; ROYSTED et al., 2015). Outro fator que pode ter auxiliado nesse resultado é a variação da incidência em relação à presença ou ausência de epidemias no ano de estudo; sabe-se que os surtos de *M. pneumoniae* ocorrem entre 4 a 7 anos, o estudo pode ter sido conduzido entre esse período (BÉBÉAR, 2007; HOLTER et al., 2015; LIU; DASARAJU; LIU, 1996; VERVLOET; MARGUET; CAMARGOS, 2007).

O conhecimento da prevalência de patógenos atípicos, como o *M. pneumoniae*, é de extrema importância e pouco conhecido no Brasil (VERVLOET et al., 2012). A incidência desse patógeno varia de acordo com a região do mundo, e estudos epidemiológicos são necessários para o tratamento adequado, pois o tratamento de escolha normalmente é feito com antibióticos betalactâmicos, que não são ativos contra tais bactérias (ARNOLD et al., 2007). Como será descrito mais adiante, o tratamento com betalactâmicos foi prescrito na maior parte dos casos ambulatoriais, o que pode ocasionar falha terapêutica em caso de infecção por bactérias atípicas.

5.4.2 Prevalência de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* por métodos moleculares

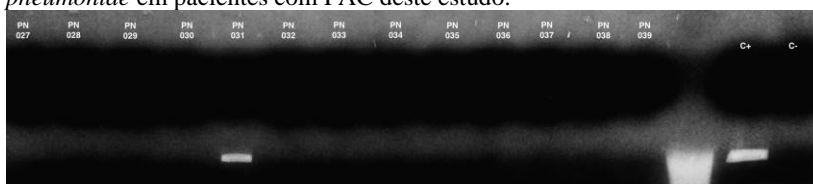
Das 58 amostras de raspado de orofaringe testadas para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* pela metodologia da PCR, 41,38% (n=24) apresentaram positividade para *H. influenzae* e 15,52% (n=9) para *S. pneumoniae*, como apresentado nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Destes, 29,31% (n=17) foram detectados como patógenos únicos e, em 13,79% (n=8) dos casos, ambas bactérias foram detectadas.

Figura 21 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de *H. influenzae* em pacientes com PAC deste estudo.



Legenda: C-: controle negativo; C+: controle positivo; PN: paciente com PAC e número do paciente. Foto representativa da reação de PCR para o gene proteína externa P6 (*ompP6*) de *H. influenzae* em amostras de raspado de orofaringe de pacientes com PAC deste estudo, observando fragmento de 269 pb no controle positivo e paciente PN-019. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Figura 22 – Foto representativa da reação de PCR para detecção de *S. pneumoniae* em pacientes com PAC deste estudo.



Legenda: C-: controle negativo; C+: controle positivo; PN: paciente com PAC e número do paciente. Foto representativa da reação de PCR para o gene da lipoproteína do sistema de transporte de ferro ABC (*piaA*) para *S. pneumoniae* em amostras de raspado de orofaringe de pacientes com PAC deste estudo, observando fragmento de 844 pb no controle positivo e paciente PN-031. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A alta prevalência de *H. influenzae* comparada a estudos anteriores, que variam de 3,4 a 28%, é incomum (FERNÁNDEZ-SABÉ et al., 2003; HOLTER et al., 2015; KOTHE et al., 2008; LIM et al., 2001; ROYSTED et al., 2015; TAKAHASHI et al., 2013). A explicação para tal achado pode estar relacionada com os iniciadores utilizados, que amplificam a sequência tanto de *H. influenzae*, como de *H. parainfluenzae* e *H. haemolyticus*, os quais apresentam o mesmo tamanho de banda, o que foi observado após análise na base de dados (*Genbank*). Sabendo que tais bactérias também colonizam o trato

respiratório, tal fato pode ter contribuído para a alta prevalência neste estudo (ANDERSON et al., 2012; MORTON et al., 2012; TAYLOR et al., 1992). A alta prevalência de *H. influenzae* no estudo pode estar relacionada também ao grande número de pacientes com DPOC (39,66%; n=23), como já relatado por alguns autores (APISARNTHANARAK; MUNDY, 2005; ROYSTED et al., 2015). Do paciente (PN-056) em que o *H. influenzae* foi isolado por cultura de LBA, houve a detecção pelo método de PCR neste estudo, sendo considerado como patógeno causador da PAC.

A alta prevalência de *S. pneumoniae* não foi evidenciada neste estudo, quando comparada a outras pesquisas, que variam entre 14 a 48%, sendo considerado o patógeno mais isolado nos casos de PAC. Deve levar-se em consideração a utilização de mais de uma metodologia pelos outros autores, como hemocultura, testes sorológicos, pesquisa de antígenos urinários e testes de biologia molecular para a detecção deste patógeno, enquanto, neste estudo, utilizou-se apenas a reação de PCR (DONALISIO et al., 2011; FERNÁNDEZ-SABÉ et al., 2003; HOLTER et al., 2015; KOTHE et al., 2008; LIM et al., 2001; ROYSTED et al., 2015).

Assim, diferentemente do demonstrado na literatura, a prevalência de *H. influenzae* parece ser maior do que de *S. pneumoniae* nas amostras analisadas. Entretanto, tal achado deve ser confirmado por metodologias adicionais.

6 CONCLUSÕES

Este estudo caracterizou uma população de pacientes com PAC atendidos em um hospital de referência de alta complexidade em Blumenau, no Estado de Santa Catarina. Foi realizada a padronização e aplicação de técnicas moleculares para detecção dos principais agentes etiológicos bacterianos em raspado de orofaringe e foram avaliados os critérios clínicos de estratificação da doença, bem como a aderência dos clínicos às Diretrizes Brasileiras para diagnóstico e tratamento de PACs.

A reação de PCR realizada com os iniciadores desenhados neste estudo para *M. pneumoniae* apresentou sensibilidade 10x maior que a reação mais citada na literatura, e a sensibilidade das reações para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* foi 0,1ng de DNA/reação.

H. influenzae foi o patógeno mais detectado por métodos moleculares, seguido de *S. pneumoniae*, apontando resultados distintos de outros estudos. *M. pneumoniae* não foi detectado em nenhuma amostra analisada por métodos de cultura, PCR e sorologia com anticorpos específicos IgM. Todavia não se exclui a circulação dessa bactéria na região, devido à presença de anticorpos IgG específicos nestes pacientes. O conhecimento da prevalência dos principais patógenos é fundamental para indicar o tratamento mais adequado em cada população, uma vez que patógenos atípicos são naturalmente resistentes aos antibióticos comumente prescritos nos casos de PAC.

A maioria dos pacientes com PAC avaliados apresentou idade igual ou superior 65 anos e grande parte, pelo menos uma comorbidade, (HAS, DPOC, DM e tabagismo prévio foram as mais prevalentes). Observou-se diferença estatística entre os pacientes que foram hospitalizados e aqueles que foram tratados ambulatoriamente, sendo o tempo médio de internação de 9,08 dias e a taxa de mortalidade em 30 dias de 18,37%. A maioria dos pacientes apresentou quatro ou mais sinais e sintomas, sendo os mais prevalentes a dispneia, tosse, secreção purulenta e crepitações.

Evidencia-se, neste estudo, a baixa aderência dos clínicos às Diretrizes Brasileiras sobre pneumonias: a falta de avaliação da gravidade das PAC e decisão de internação auxiliada pelo escore CURB-65 contida nas Diretrizes estava ausente na maior parte dos prontuários. A ausência da adesão também foi observada na prescrição dos antibióticos, em que a escolha para um quarto dos pacientes não estava de acordo com a determinação das Diretrizes. Ainda de acordo com a normativa, para os pacientes com PAC grave admitidos na UTI,

pacientes em que houve falha terapêutica, etilistas e com cavitação na radiologia torácica, o pedido de exames microbiológicos é necessário, entretanto, não foi verificado o cumprimento dos procedimentos descritos nas Diretrizes em todos os casos. Alerta-se ainda para o fato da ausência de todos os exames preconizados pela Diretriz num montante de 25,92% (n=7) destes pacientes.

Indica-se a replicação desta pesquisa para o melhor entendimento da PAC, além de acompanhar os ciclos epidêmicos de *M. pneumoniae* na região, uma vez que não foi observada a incidência do patógeno no ano do estudo. A pesquisa dos principais patógenos, como citado anteriormente, auxilia no tratamento mais adequado e recomendam-se ainda novas pesquisas com diferentes metodologias para o conhecimento etiológico dos casos de PAC.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados recorrentes do presente trabalho abrem perspectivas para a replicação, devido aos seguintes motivos:

- Realizar pesquisa de *M. pneumoniae* em crianças e adultos jovens nesta região, visto que o presente trabalho utilizou como amostra adultos, principalmente idosos, havendo, portanto, uma lacuna nesta área de conhecimento;

- Utilização de outras metodologias de pesquisa microbiológica, para a confirmação ou refutação dos resultados encontrados;

- Utilização da mesma metodologia para avaliar os ciclos epidêmicos de *M. pneumoniae*, tendo em vista a presença de epidemias a cada 4 a 7 anos;

- Em virtude da prevalência da amostra deste trabalho ser hospitalar, utilizar as unidades de atenção primária à saúde para a avaliação de casos brandos.

8 REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. May, p. 91–95, 2003.

ALAVI-MOGHADDAM, M. et al. Pneumonia severity index compared to CURB-65 in predicting the outcome of community acquired pneumonia among patients referred to an Iranian emergency department: A prospective survey. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 179–183, 2013.

ALFRADIQUE, M. E. et al. Ambulatory care sensitive hospitalizations: elaboration of Brazilian list as a tool for measuring health system performance (Project ICSAP--Brazil). **Cadernos de saúde publica**, v. 25, n. 6, p. 1337–1349, 2009.

ALMEIDA, J. R. DE; FERREIRA FILHO, O. F. Pneumonias adquiridas na comunidade em pacientes idosos: aderência ao Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 3, p. 229–236, 2004.

ANDERSON, R. et al. Haemophilus haemolyticus isolates causing clinical disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2462–2465, 2012.

ANVISA. **TRATO RESPIRATÓRIO : Critérios Nacionais de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/control/criterios_infeccao_trato_respiratorio.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2013.

APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Etiology of community-acquired pneumonia. **Clinics in Chest Medicine**, v. 26, n. 1, p. 47–55, 2005.

ARNOLD, F. W. et al. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 11, p. 1086–1093, 2007.

BANTAR, C. et al. Neumonía aguda adquirida en la comunidad en adultos: Actualización de los lineamientos para el tratamiento antimicrobiano inicial basado en la evidencia local del Grupo de Trabajo de Sudamérica (Consensur II). **Revista Chilena de Infectología**, v. 27, p. 9–38, 2010.

BARTLETT, J. M. S. et al. **PCR Protocols**. 2nd. ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2003. v. 226

BASNAYAKE, T. L.; WATERER, G. W. Rapid diagnostic tests for defining the cause of community-acquired pneumonia. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 185–192, 2015.

BÉBÉAR, C. M. Physiopathologie et diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 47, n. 7, p. 438–441, nov. 2007.

BLASI, F. et al. Can CAP guideline adherence improve patient outcome in internal medicine departments? **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 4, p. 902–910, 2008.

BRASIL. **Técnicas para Coleta de Sangue**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0108tecnicas_sangue.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2013.

BRASIL. **Cartilha Entendendo o SUS**. Disponível em: <http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=3242&Itemid=82>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas**. 1a. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

CABRE, M. Pneumonia in the elderly. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 3, p. 223–229, 2009.

CAMPOS, J. et al. Analysis of Invasive Haemophilus influenzae Infections after Extensive Vaccination against H. influenzae Type b. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 524–529, 2004.

CAO, B.; QU, J. Research progress in atypical pathogens of community acquired pneumonia. **Community Acquired Infection**, v. 1, n. 1, p. 11, 2014.

CARDOSO, A. P. et al. Pneumonias adquiridas na comunidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 24, n. 2, p. 66–72, 1998.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651–656, 2009.

CASTRO, R. et al. Comorbidades e sinais de alerta da pneumonia adquirida na comunidade: análise de pacientes com mais de 50 anos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 70–73, 2008.

CHANDRA, A. et al. A multicenter analysis of the ED diagnosis of pneumonia. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 28, n. 8, p. 862–865, 2010.

CHAUVET, P.; COSTA, W.; FARIA, A. C. Pneumonia Adquirida Na Comunidade. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 9, n. 2, p. 17–29, 2010.

CHEN, F. Q. et al. Prevalence of Mycoplasma pneumoniae : A cause for community - acquired infection among pediatric populaztion. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 18, n. 3, p. 354–358, 2015.

CHEN, Z. et al. Epidemiology and associations with climatic conditions of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydomphila pneumoniae infections among Chinese children hospitalized with acute respiratory infections. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 39, n. 34, jan. 2013.

CHUANG, L.-Y.; CHENG, Y.-H.; YANG, C.-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 10, p. 1541–9, 2013.

COLICE, G. L. et al. Treatment Costs of Community-Acquired Pneumonia in an Employed Population Treatment Costs of Community-Acquired Pneumonia in an Employed Population. **Chest Journal**, v. 125, n. 6, p. 2140–2145, 2004.

CORRÊA, R. D. A. et al. Estudo de casos hospitalizados por pneumonia comunitária no período de um ano. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 5, p. 243–248, 2001.

CORRÊA, R. D. A. et al. Diretrizes da SBPT Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 6, p. 574–601, 2009.

CUNHA, B. **Pneumonia Essentials 2010**. 3a. ed. Sudbury: Physicians Press, 2009.

CUPURDIJA, V. et al. Community-acquired pneumonia: economics of inpatient medical care vis-à-vis clinical severity. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 1, p. 48–57, 2015.

DA CUNHA, C. A. et al. Antimicrobial Therapy for Community-Acquired Pneumonia in Adults. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 6, n. 2, p. 82–87, 2002.

DE BARBEYRAC, B. et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. S83–S89, 1993.

DENNY, F. W.; CLYDE, W. A.; GLEZEN, W. P. Mycoplasma pneumoniae Disease: Clinical Spectrum, Pathophysiology, Epidemiology, and Control. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 123, n. 1, p. 74–92, 1971.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR methods and applications**, v. 3, p. S30–S37, 1993.

DONALISIO, M. R. et al. Perfil clínico, epidemiológico e etiológico de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade internados em um hospital geral da microrregião de Sumaré, SP. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 2, p. 200–208, 2011.

DUMKE, R. et al. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia spp . Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany, 2011-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 426–434, 2015.

DUNITZ, M. **Pneumonia: Pocketbook**. 1a. ed. London: Martin Dunitz Ltd, 1996.

EBRAHIMZADEH, A. et al. Clinical and Laboratory Findings in Patients With Acute Respiratory Symptoms That Suggest the Necessity of a Chest X-ray for Community-Acquired Pneumonia. **Iranian Journal of Radiology**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2014.

ELIAS, E.; MAGAJEWSKI, F. A Atenção Primária à Saúde no sul de Santa Catarina: uma análise das internações por condições sensíveis à atenção ambulatorial, no período de 1999 a 2004. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 4, p. 633–647, 2008.

ERDEM, H. et al. The interrelations of radiologic findings and mechanical ventilation in community acquired pneumonia patients admitted to the intensive care unit: a multicentre retrospective study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 5, p. 1–5, 2014.

FARR, B. M. et al. Risk factors for community-acquired pneumonia diagnosed upon hospital admission. British Thoracic Society Pneumonia Study Group. **Respiratory medicine**, v. 94, n. 10, p. 954–963, 2000.

FEIN, A. et al. **Diagnosis and Management of Pneumonia and Other Respiratory Infections**. New York: A Medical Publishing Company, 2006.

FERNÁNDEZ-SABÉ, N. et al. Community-acquired pneumonia in very elderly patients: causative organisms, clinical characteristics, and outcomes. **Medicine**, v. 82, n. 3, p. 159–169, 2003.

FILE JR., T. M. Community-acquired pneumonia. **The Lancet**, v. 362, p. 1991–2001, 2003.

FINE, M. J. et al. Processes and outcomes of care for patients with community-acquired pneumonia: results from the Pneumonia Patient Outcomes Research Team (PORT) cohort study. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 9, p. 970–980, 1999.

GLEASON, P. P. et al. Associations between initial antimicrobial therapy and medical outcomes for hospitalized elderly patients with pneumonia. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 21, p. 2562–2572, 1999.

GREENFIELD, L.; WHITE, T. J. Sample Preparation Methods. In: PERSING, D. H. et al. (Eds.). . **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Rochester: Mayo Foundation, 1993. p. 122–137.

HAGAMAN, J. T. et al. Admission chest radiograph lacks sensitivity in the diagnosis of community-acquired pneumonia. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 337, n. 4, p. 236–240, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95–98, 1999.

HOLTER, J. C. et al. Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 64, p. 1–11, 2015.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). . **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 3–12.

JACKSON, M. L. et al. The burden of community-acquired pneumonia in seniors: results of a population-based study. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, p. 1642–1650, 2004.

JANSSENS, J.-P. Pneumonia in the elderly (geriatric) population. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, p. 226–230, 2005.

JATON, K.; SCHRENZEL, J.; GREUB, G. Diagnostic Microbiologique de la pneumonie. **Revue Médicale Suisse**, v. 10, n. 450, p. 2126–2129, 2014.

JOKINEN, C. et al. Incidence of Community-Acquired Pneumonia in the Population of Four Municipalities in Eastern Finland. **American Journal Of Epidemiology**, v. 137, n. 9, p. 977*988, 1993.

JOSÉ, R. J.; PERISELNERIS, J. N.; BROWN, J. S. Community-acquired pneumonia. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 21, n. 3, p. 212–218, 2015.

KAIS, M. et al. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, n. 3, p. 169–178, 2006.

KALIN, M.; LINDBERG, A. A. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: a comparison between microscopic examination of expectorate, antigen detection and cultural procedures. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 247–255, 1983.

KENNY, G. E. et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: Sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 2087–2093, 1990.

KETEL, R. J. V. A. N.; WEVER, B. D. E.; ALPHEN, L. V. A. N. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. **Journal of Medical Microbiology**, v. 33, p. 271–276, 1990.

KOBAYASHI, H. et al. Improving clinical significance of PCR: Use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 9, p. 1243–1247, 2009.

KOIVULA, I.; STEN, M.; MÄKELÄ, P. H. Risk factors for pneumonia in the elderly. **American Journal of Medicine**, v. 96, n. 4, p. 313–320, 1994.

KOTHE, H. et al. Outcome of community-acquired pneumonia: Influence of age, residence status and antimicrobial treatment. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 1, p. 139–146, 2008.

KOVACIC, R.; GRAU, O.; BLANCHARD, A. PCR: Selection of Target Sequences. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.). . **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology**. 2nd. ed. San Diego: Academic Press, 1996. p. 53–60.

LIM, W. S. et al. Study of community acquired pneumonia aetiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. **Thorax**, v. 56, n. 1, p. 296–301, 2001.

LIM, W. S. et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. **Thorax**, v. 58, n. 3, p. 377–382, 2003.

LIM, W. S. et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. **Thorax**, v. 64, p. iii1–i55, 2009.

LIU, P.; DASARAJU, V.; LIU, C. Infections of the Respiratory System. In: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiology**. 4th. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

LOENS, K. et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in spiked clinical samples by nucleic acid sequence-based amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1339–1345, 2002.

MACHADO, A. A. et al. Participação do *Mycoplasma pneumoniae* na etiologia de infecções respiratórias agudas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 43–50, 1991.

MANDELL, L. A et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clinical infectious diseases**, v. 44, p. S27–S72, 2007.

MANDELL, L. A. Epidemiology and etiology of community-acquired pneumonia. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 761–776, 2004.

MELBYE, H. et al. Diagnosis of Pneumonia in Adults in General Practice. **Scandinavian Journal Primary Health Care**, v. 10, p. 226–233, 1992.

MORTON, D. J. et al. An invasive *Haemophilus haemolyticus* isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1502–1503, 2012.

MURDOCH, D. R. et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 63–66, 2003.

MUSHER, D. M. *Haemophilus Species*. In: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiology**. 4th. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

NEDEL, F. B. et al. Características da atenção básica associadas ao risco de internar por condições sensíveis à atenção primária: revisão sistemática da literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 1 – 15, 2010.

OSUNA, A. et al. Pneumonia adquirida na comunidade e Pneumonia Severity Index 20 (PSI-20): um estudo de 262 doentes. **Medicina Interna**, v. 13, n. 3, p. 162–171, 2006.

PARTOUCHE, H. et al. Suspected community-acquired pneumonia in an ambulatory setting (CAPA): a French prospective observational cohort study in general practice. **Primary Care Respiratory Medicine**, v. 25, 2015.

PATEL, N. K.; VIRANI, N. P. Principle and Tools for Primer Design. **Atmiya Spandan**, v. 1, n. 1, p. 79 – 95, 2013.

PATTERSON, M. J. Streptococcus. In: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiology**. 4th. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. v. 21p. 71–83, 1996.

QASEM, J. A et al. Polymerase chain reaction as a sensitive and rapid method for specific detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. **Microbiological Research**, v. 157, n. 2, p. 77–82, 2002.

RÄTY, R.; RÖNKKÖ, E.; KLEEMOLA, M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 287–291, 2005.

RIQUELME, R. et al. Community-acquired Pneumonia in the Elderly. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1908–1914, 1997.

RODRIGUES, J. C.; SILVA FILHO, L. V. F.; BUSH, A. Diagnóstico etiológico das pneumonias - uma visão crítica Etiological diagnosis of pneumonia – a critical view. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. Supl. 2, p. S129–S140, 2002.

ROSÓN, B. et al. Etiology, reasons for hospitalization, risk classes, and outcomes of community-acquired pneumonia in patients hospitalized on the basis of conventional admission criteria. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, p. 158–165, 2001.

ROYSTED, W. et al. Aetiology and risk factors of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Norway. **Clinical Respiratory Journal**, 2015.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANHUEZA, L. et al. Evaluación y manejo del adulto inmunocompetente hospitalizado por neumonía adquirida en la comunidad, en un hospital de baja complejidad, basado en la Guía Clínica Chilena. **Revista Médica de Chile**, v. 137, p. 1283–1290, 2009.

SCHMIDT, A.; KAUFMANN, S. H. E.; WOLFF, M. H. **Community-Acquired Pneumonia**. 1a. ed. Boston: Birkhauser, 2007.

SCHWARTZMANN, P. V. et al. Pneumonia comunitária e pneumonia hospitalar em adultos. **Medicina**, v. 43, n. 3, p. 238–248, 2010.

SHARP, S. E.; ROBINSON, A. N. N.; SAUBOLLE, M. COORDINATING EDITOR. **Public Health**, 2004.

SHE, R. C. et al. Limited Utility of Culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for Diagnosis of Respiratory Tract Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3380–3382, 2010.

SIGNORI, L. G. H. et al. Exame do escarro no manejo clínico dos pacientes com pneumonia adquirida na comunidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 3, p. 152–158, 2008.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. PCR primer design. **Molecular Biology Today**, v. 2, n. 2, p. 27–32, 2001.

SKAKNI, L. et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2638–2643, 1992.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Parte I – Pneumonia adquirida na comunidade (PAC). **Jornal de Pneumologia**, v. 27, p. S3–S21, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretriz para Pneumonias Adquiridas na Comunidade (PAC) em

Adultos Imunocompetentes. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S1–S24, 2004.

SPEIZER, F. E. et al. Respiratory Diseases of Adults. In: JAMISON, D. T. et al. (Eds.). . **Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2nd. ed. Washington, D. C.: World Bank, 2006. p. 681–694.

STRÅLIN, K. et al. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 643–645, 2006.

SYSTEM, T. S. **Sample Dize Calculator**. Disponível em: <<http://www.surveysystem.com/sscalc.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

TAKAHASHI, K. et al. The incidence and aetiology of hospitalised community-acquired pneumonia among Vietnamese adults: a prospective surveillance in Central Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 296, 2013.

TAYLOR, D. C. et al. Biotypes of Haemophilus parainfluenzae from the respiratory secretions in chronic bronchitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 279–282, 1992.

TEARE, J. M. et al. Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. **BioTechniques**, v. 22, n. 6, p. 1170–1174, 1997.

TOYOSHIMA, M. T. K.; ITO, G. M.; GOUVEIA, N. Morbidade por doenças respiratórias em pacientes hospitalizados em São Paulo/SP. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 209–213, 2005.

VAN DER EERDEN, M. M. et al. Value of intensive diagnostic microbiological investigation in low- and high-risk patients with community-acquired pneumonia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 241–249, 2005.

VERVLOET, L. A. et al. Clinical, radiographic and hematological characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 6, p. 480–487, 2010.

VERVLOET, L. A. et al. Pneumonia adquirida na comunidade e derrame pleural parapneumônico relacionados a *Mycoplasma pneumoniae* em crianças e adolescentes. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 2, p. 226–236, 2012.

VERVLOET, L. A.; MARGUET, C.; CAMARGOS, P. A. M. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 507–514, 2007.

WAITES, K. B. et al. **CUMITECH 34 – Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections**. 2001.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 697–728, 2004.

WARING, A. L. et al. Development of a Genomics-Based PCR Assay for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a Large Outbreak in New York State. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1385–1390, 2001.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L. Diagnosis and management of community-acquired pneumonia in adults. **Clinics in Chest Medicine**, v. 83, p. 1299–306, 2011.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L. **Pneumonia: Diagnosis and Management of Community- and Hospital-Acquired Pneumonia in Adults**. London: National Clinical Guideline Centre, 2014.

WESEMANN, T. et al. Pneumonia severity, comorbidity and 1-year mortality in predominantly older adults with community-acquired pneumonia: a cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 1–6, 2015.

WHALAN, R. H. et al. Distribution and genetic diversity of the ABC transporter lipoproteins PiuA and PiaA within *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1031–8, fev. 2006.

APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEPSH)

UNIVERSIDADE REGIONAL DE
BLUMENAU- FURB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico da Pneumonia Atípica Primária: prevalência de *Mycoplasma pneumoniae* e resistência aos antimicrobianos

Pesquisador: Caio Mauricio Mendes de Cordova

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18406813.1.0000.5370

Instituição Proponente: Universidade Regional de Blumenau- FURB

Patrocinador Principal: Universidade Regional de Blumenau- FURB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 353.635

Data da Relatoria: 25/07/2013

Apresentação do Projeto:

A doença causada por *Mycoplasma pneumoniae* (MP) é similar as causadas por um grupo de bactérias patogênicas de crescimento lento que inclui *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila* e apresentam sintomas clínicos semelhantes nas infecções do trato respiratório (ITR). MP infecta tanto o trato respiratório inferior como o superior ocorrendo endemicamente e epidemicamente em todo o mundo em crianças e adultos, sendo responsável por 15 a 20% das pneumonias comunitárias, podendo chegar a 40% nas crianças e considerado o segundo agente etiológico mais frequente. Porém, a incidência desse patógeno geralmente não é conhecida no Brasil, tendo seu diagnóstico na maioria das vezes por testes sorológico, o que acaba por fornecer um diagnóstico apenas retrospectivo. Na prática diária, o tratamento para pneumonias comunitárias normalmente é empírico, baseado na epidemiologia, sinais clínicos, radiológicos e características laboratoriais associadas com certos patógenos, porém, apesar de MP apresentar sintomas clínicos semelhantes a outras ITRs, devido à sua falta de parede celular e resistente aos antibióticos beta-lactâmicos, comumente utilizados como tratamento. É também importante mencionar o aumento da resistência desses organismos aos macrolídeos, sendo encontrada uma resistência de até 90% nas cepas isoladas em certos países.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primario:**

Determinar a prevalência de *Mycoplasma pneumoniae* e o nível de resistência aos antimicrobianos em pacientes com suspeita clínica de Pneumonia Atípica Primária

Objetivo Secundário:

- Determinar a prevalência de *M. pneumoniae* por cultura;
- Determinar a prevalência de *M. pneumoniae* por PCR;
- Determinar a prevalência de *M. pneumoniae* por sorologia;
- Comparar a eficiência diagnóstica entre as metodologias utilizadas;
- Determinar o nível de resistência de *M. pneumoniae* aos antimicrobianos mais comuns usados no tratamento;
- Discutir a importância do diagnóstico preciso da Pneumonia Atípica Primária;
- Comparar a prevalência de *M. pneumoniae* em crianças e adultos; - Comparar a prevalência de *M. pneumoniae* em nossa população com outros estudos;
- Determinar a eventual ocorrência de picos sazonais de infecção por *M. pneumoniae*;
- Determinar os sintomas clínicos prevalentes em pacientes infectados por *M. pneumoniae*;
- Discutir a associação da infecção por *M. pneumoniae* com outras doenças do trato respiratório, com base na análise dos prontuários;
- Avaliar fatores de risco para a infecção de *M. pneumoniae*

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Não há riscos envolvidos, apenas um eventual desconforto relacionado ao processo de obtenção das amostras biológicas.

Benefícios:

Possibilitar o diagnóstico correto nos casos de suspeita de infecção respiratória, verificar se o microrganismo que possa estar presente é resistente a algum antibiótico, e assim possibilitar o tratamento mais adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em relação ao método de coleta é preciso ressaltar que serão investigados pacientes adultos e crianças com suspeita de Pneumonia Atípica Primária atendidos no Hospital Santa Isabel, em Blumenau, SC, mediante Termo de Consentimento Livre Esclarecido TCLE. Serão excluídos do

estudo os pacientes, ou responsáveis, que não assinarem o Termo. Espera-se alcançar um número de 100 indivíduos estudados nesse projeto. Amostras: swab de garganta, traqueal, nariz e boca, aspiração traqueal, secreção traqueal e brônquica, expectoração, ou lavagem bronco-alveolar, serão coletadas a critério do clínico responsável. As amostras serão mantidas em meio de transporte 2SP. Para a sorologia serão obtidos 5 ml de sangue O diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* em pneumonias comunitárias ainda não é preciso no Brasil, e não faz parte da rotina diagnóstica clínica. A utilização concomitante das técnicas de cultura, PCR e testes sorológicos está longe de ser uma realidade para a maioria dos laboratórios

brasileiros. A falta do conhecimento do agente etiológico em pneumonias atípicas acaba causando muitas vezes o tratamento empírico, tendo a identificação epidemiológica, clínica, radiológica, e laboratorial associada a características com certos patógenos. Porém, a infecção por MP deve ser considerada no diagnóstico diferencial, já que é naturalmente resistente aos antibióticos betalactâmicos comumente utilizados para o tratamento (Vervloet et al, 2007). Isso faz com que o presente estudo seja inédito no país, porém uma problemática já conhecida em muitos laboratórios e centros de pesquisa no exterior. Através do presente estudo poderemos obter o conhecimento da prevalência de *Mycoplasma pneumoniae* como responsável por pneumonias atípicas primárias, associá-lo com outras doenças do sistema respiratório, e aprimorar o tratamento através da observação dos níveis de resistência aos antimicrobianos visando um tratamento eficaz e correto. Já existem dados a respeito da soroprevalência de MP em certas regiões do país, mas em santa Catarina nossos resultados serão originais, e o eventual isolamento de cepas por cultura e

determinação dos níveis de resistência aos antimicrobianos seria inédito. Esses dados são extremamente relevantes, principalmente no contexto da realidade atual de crescente existência bacteriana aos antibióticos disponíveis. No Brasil, não há nenhuma informação a respeito da prevalência da resistência de *M. pneumoniae*, e o tratamento continua sendo empírico, sem base diagnóstica da etiologia precisa. Além disso, esse trabalho possibilitará a comparação de 3 metodologias: sorologia, cultura e PCR, com a avaliação de suas sensibilidades relativas, e determinação da melhor metodologia, ou combinação delas, que possibilite a maior eficácia diagnóstica em nossa realidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Realizar correção de português e linguagem utilizados no projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BLUMENAU, 08 de Agosto de 2013

Assinador por:
Mercedes Gabriela Ratto Reiter
(Coordenador)

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1. Identificação do Projeto de Pesquisa	
Título do Projeto: Diagnóstico da Pneumonia Atípica Primária: prevalência de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Área do Conhecimento: Saúde	
Curso: Farmácia	
Número de sujeitos no centro: 100	Número total de sujeitos: 100
Patrocinador da pesquisa: n.a.	
Instituição onde será realizado: Universidade de Blumenau	
Nome dos pesquisadores e colaboradores: Caio M. M. de Cordova, Lais Del Prá Netto Machado	

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

2. Identificação do Sujeito da Pesquisa	
Nome:	
Data de Nascimento:	Nacionalidade:
Estado Civil:	Profissão:
CPF/MF:	RG:
Endereço:	
Telefone:	E-mail:
3. Identificação do Pesquisador Responsável	
Nome: Caio Mauricio Mendes de Cordova	
Profissão: farmacêutico-bioquímico	N.do Registro no Conselho: CRF-SC 3063
Endereço: Rua Sao Paulo 2171, Campus III, FURB, Depto. Ciências Farmaceuticas	
Telefone: 47 3321 7318	E-mail: cmcordova@furb.br

Eu, sujeito da pesquisa, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima identificado. Discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar e estou ciente que:

1. O **objetivo** desta pesquisa é conhecer a prevalência da bactéria *Mycoplasma pneumoniae* como responsável por pneumonias atípicas primárias, associá-lo com outras doenças do sistema respiratório, e aprimorar o tratamento através da observação dos níveis de resistência aos antimicrobianos visando um tratamento eficaz e correto.
2. O **procedimento** para **coleta de dados** envolverá a coleta de amostras biológicas (raspado de garganta, traqueal, nariz e boca, aspiração traqueal, secreção traqueal e brônquica, expectoração, ou lavagem bronco-alveolar, serão coletadas a critério do clínico responsável, e uma pequena amostra de sangue) e a realização de exames com essas amostras, como cultura,

pesquisa do microrganismo por métodos de detecção do DNA, e pesquisa de anticorpos no sangue.

3. O **benefício** esperado é possibilitar o diagnóstico correto nos casos de suspeita de infecção respiratória, verificar se o microrganismo que possa estar presente é resistente a algum antibiótico, e assim possibilitar o tratamento mais adequado.
4. O **desconforto** e o **risco** esperado é limitado ao procedimento de coleta das amostras biológicas, que é um tanto simples, comumente realizado para esse tipo de diagnóstico.
5. A **minha participação** neste projeto tem como objetivo apenas concordar com a coleta das amostras necessárias para o exame, e aguardar a orientação sobre os procedimentos a serem realizados após o diagnóstico, pelo seu médico.
6. A **minha participação é isenta de despesas** e **tenho direito** a conhecer os resultados dos exames decorrentes de minha participação na presente pesquisa.
7. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
8. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento, na assistência ou no tratamento médico.
9. Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
10. Poderei consultar o **pesquisador responsável** (acima identificado), sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.
11. Tenho a garantia de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial(is) e final(is) desta pesquisa.

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma em minha posse.

_____ (), _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável pelo Projeto

Prof. Dr. Caio M. M. de Cordova

Testemunhas:

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

Nome:

RG:

CPF/MF:

Telefone:

Nome:

RG:

CPF/MF:

Telefone:

