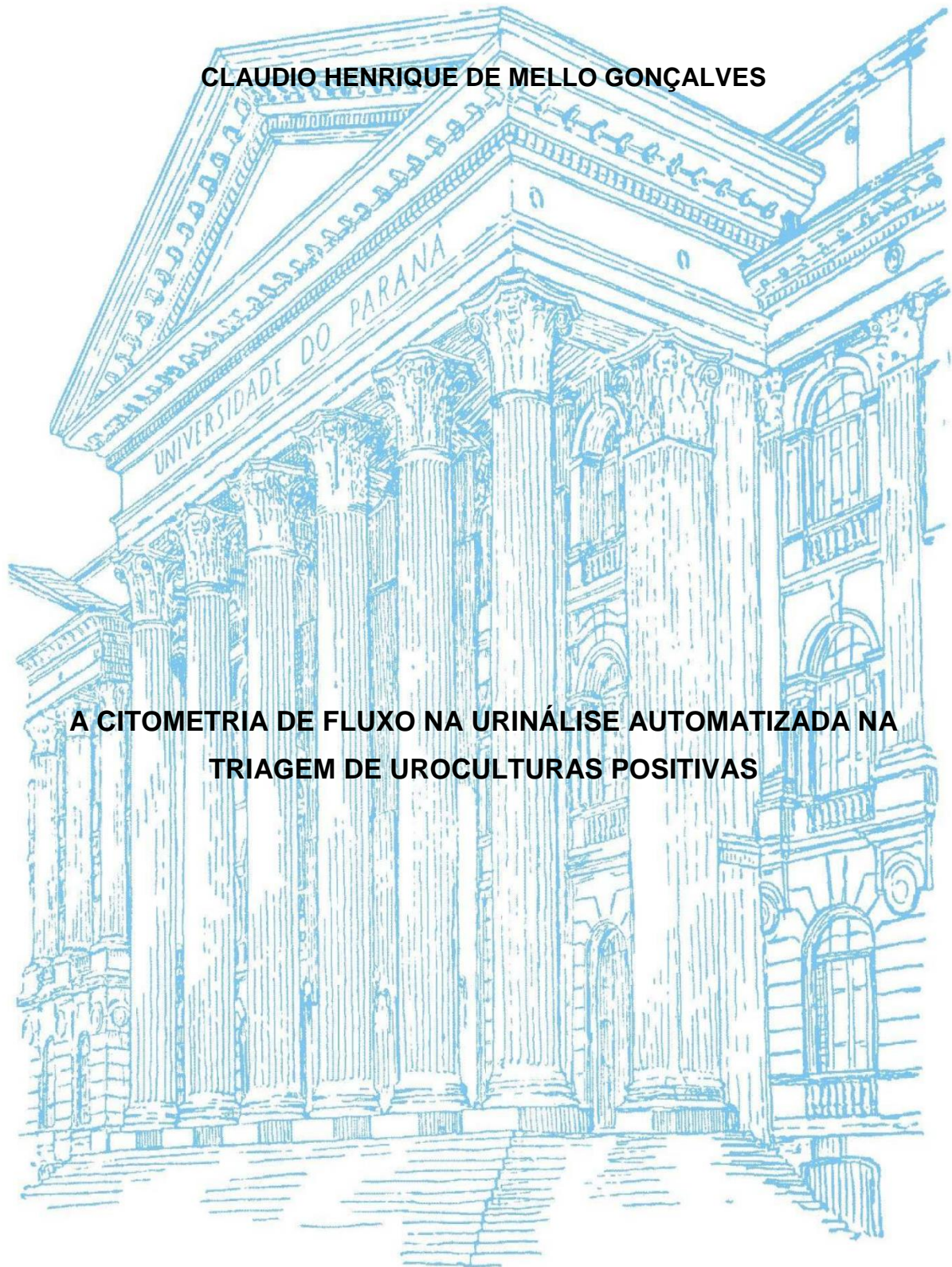


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLAUDIO HENRIQUE DE MELLO GONÇALVES

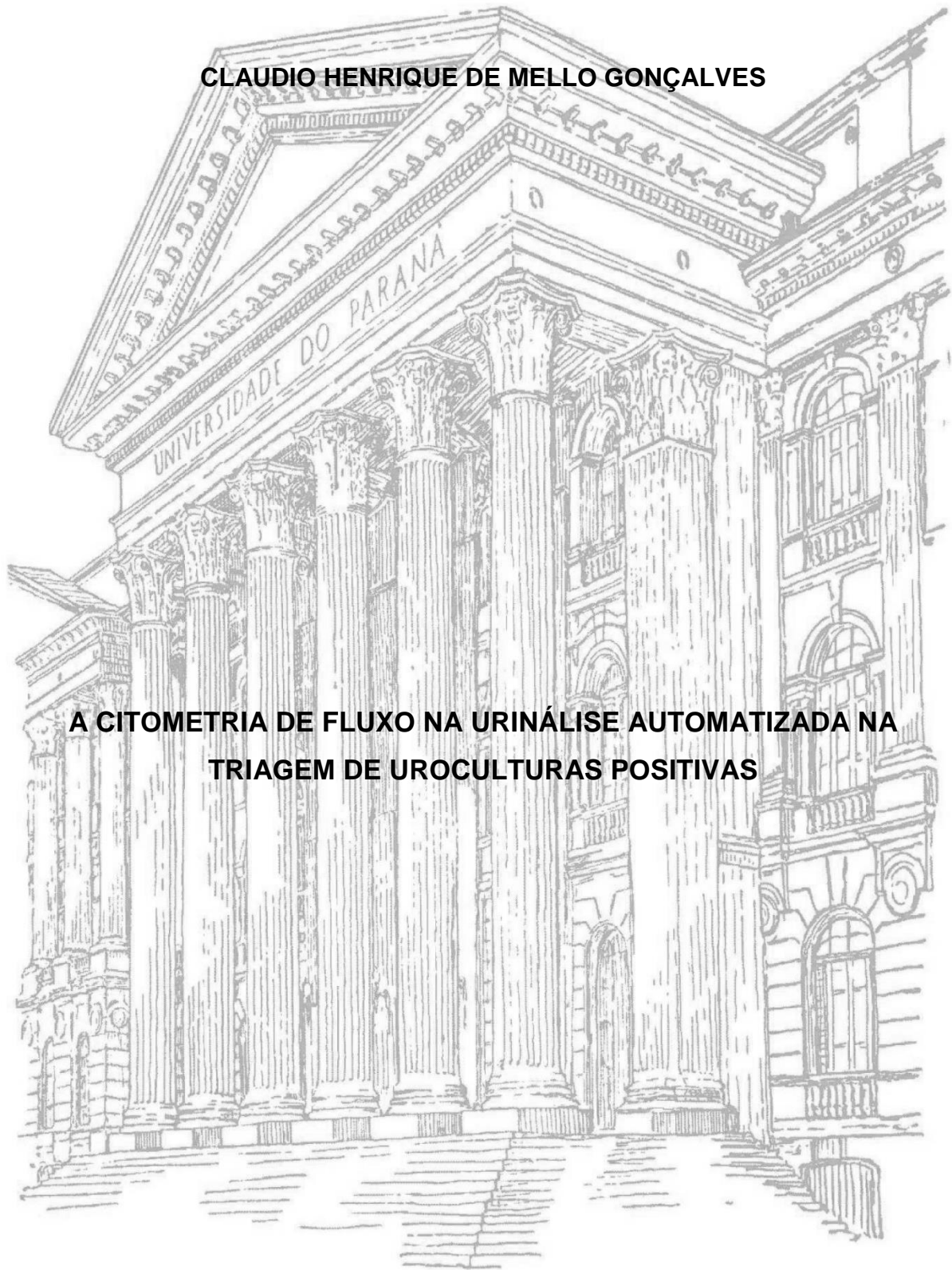


**A CITOMETRIA DE FLUXO NA URINÁLISE AUTOMATIZADA NA
TRIAGEM DE UROCULTURAS POSITIVAS**

CURITIBA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLAUDIO HENRIQUE DE MELLO GONÇALVES



**A CITOMETRIA DE FLUXO NA URINÁLISE AUTOMATIZADA NA
TRIAGEM DE UROCULTURAS POSITIVAS**

CURITIBA
2017

CLAUDIO HENRIQUE DE MELLO GONÇALVES

**A CITOMETRIA DE FLUXO NA URINÁLISE AUTOMATIZADA NA
TRIAGEM DE UROCULTURAS POSITIVAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cyntia M. T. Fadel Picheth

Co-Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

**CURITIBA
2017**

Gonçalves Claudio Henrique de Mello

A citometria de fluxo na urinalise automatizada na triagem de uroculturas positivas /
Claudio Henrique de Mello Gonçalves – Curitiba 2017
64 f il (algumas color) 30 cm

Orientadora Professora Dra Cyntia M T Fadel-Picheth

Coorientador Professor Dr Geraldo Picheth

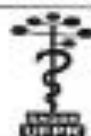
Dissertação (mestrado) – Programa de Pos Graduação em Ciências
Farmaceuticas Setor de Ciências da Saúde Universidade Federal do Parana

Inclui bibliografia

1 Urinalise 2 Citometria de fluxo 3 Urina 4 Bacterias I Fadel-Picheth Cyntia M
T II Picheth Geraldo III Universidade Federal do Parana IV Titulo

PV000915125

CDD 616 07566





TERMO DE APROVAÇÃO


CLAUDIO HENRIQUE DE MELLO GONÇALVES

Título: "A citometria de fluxo na urinálise automatizada na triagem de uroculturas positivas"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.ª. Dr.ª. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth
Orientadora


Prof.ª. Dr.ª. Mauren Isfer Anghebem Oliveira
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Gláucio Valdameri
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 22 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a Deus, por ter colocado pessoas tão maravilhosas em minha vida e por ter me concedido a graça de tornar esse trabalho factível.

Agradeço a todos, que de uma forma ou de outra contribuíram para minha vida e formação profissional e acadêmica.

À minha orientadora, professora Dr^a Cyntia M. T. Fadel-Picheth, pelo conhecimento me transmitido e ao meu co-orientador, professor Dr. Geraldo Picheth, por sua valiosa contribuição com as análises estatísticas e dicas tão relevantes nas apresentações de seminários e desta dissertação. A ambos pela oportunidade, experiência e tempo me dedicados na realização deste trabalho.

A todos os professores que nortearam minha vida contribuindo para este momento.

Ao amigo, doutorando do curso ciências farmacêuticas, Waldemar Volanski, pelo incentivo, boa vontade e ajuda com os dados da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório Municipal de Curitiba pelo incentivo e apoio na rotina em meus dias de aula.

A toda minha família que sempre me incentivou em meus estudos, em especial aos meus pais, meus primeiros professores.

À minha amada esposa Cassiana por ouvir, incentivar, apoiar e ser paciente com minhas ausências e falta de memória.

Ninguém vence sozinho e, portanto, vocês foram fundamentais na realização deste trabalho. Obrigado.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”
Aristóteles

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) são processos patológicos frequentes, especialmente em mulheres. A confirmação laboratorial do processo infeccioso é realizada pela urocultura, um ensaio laborioso que necessita 24-48 horas ou mais para emissão de um resultado. A avaliação mais antiga e rotineira do trato urinário consiste na análise de marcadores bioquímicos e citológicos em amostra de urina (urinálise), cujo resultado atrelado a analisadores automáticos pode ser liberado em tempo inferior a 4 horas. Neste estudo, aprovado pelo Comitê de Ética, foi avaliada a eficácia das contagens celulares de bactérias, leucócitos e eritrócitos, por citometria de fluxo em identificar uroculturas positivas utilizando o sistema automatizado UF 1000i (Sysmex). Dois grupos de registros laboratoriais, de indivíduos adultos (>18 anos), foram avaliados. O Grupo 1 consiste de registros obtidos no módulo usual e o Grupo 2, de registros obtidos após a ativação do módulo anti-carreamento. A identificação e frequência das principais bactérias presentes nas uroculturas positivas também foi avaliada. Foram consideradas uroculturas positivas aquelas com $\geq 10^4$ UFC/mL e negativas com $< 10^4$ UFC/mL. O Grupo 1 compreende 115.319 registros com predominância de mulheres (89%). Análises com curva ROC mostraram que as contagens de bactérias e leucócitos tem poder de identificar uroculturas positivas. As contagens de eritrócitos apresentaram discriminação pobre. O melhor discriminador foi a contagem de bactérias, com área sobre a curva (AUC) superior a 0,90 para mulheres e homens, com valor de corte de 2.163 bactérias/ μ L e 300 bactérias/ μ L, e sensibilidade >75% e >90%, respectivamente. Foi avaliado também o efeito do carreamento de bactérias entre amostras sequenciais. Uma amostra de urina com alta concentração de bactérias (1.700 a 65.800/ μ L) pode transferir para uma solução sem bactérias (Branco) cerca de 1,6% a 2,4% do conteúdo bacteriano, o que representa que esta amostra sequencial apresenta um resultado falso positivo para este elemento. Para o Grupo 2 (n=13.572; 87% mulheres) os registros foram obtidos após uma lavagem adicional do equipamento após contagens bacterianas >1000/ μ L para minimizar o arraste (*carryover*). Nesta condição a contagem bacteriana também foi o melhor discriminador de culturas positivas, para homens e mulheres, com AUC > 0,94 e sensibilidade >84% e especificidade > 92%, desempenho superior a discriminação do Grupo 1. Uma subamostra de registros do Grupo 1, com urocultura negativa e todos os marcadores bioquímicos negativos foi utilizada para estimar o intervalo de referência. Outras conclusões relevantes no estudo foram: (i) duas estirpes bacterianas foram predominantes e identificadas em cerca de 78% das uroculturas positivas, a *Escherichia coli* (64%) e o *Streptococcus agalactiae* (14%); (ii) as contagens de bactérias e leucócitos, analisados pela curva ROC, têm capacidade de discriminar uroculturas positivas, e a contagem de eritrócitos é um discriminador pobre; (iii) a ativação do módulo anti-carreamento melhora a discriminação de uroculturas positivas com a contagem bacteriana, sendo recomendado sua aplicação; (iv) valores de corte para contagens de bactérias e leucócitos para discriminar amostras com uroculturas positivas devem considerar o gênero e ativação do módulo anti-carreamento; (v) o intervalo de referência estimado para contagens celulares, utilizando o sistema automatizado UF 1000i (Sysmex) apresentou valores máximos, com intervalo de confiança de 90% para mulheres de bactérias <807/ μ L, leucócitos <24/ μ L e eritrócitos <22/ μ L; e para homens, bactérias <271/ μ L, leucócitos <12/ μ L e eritrócitos <14/ μ L; (vi) as contagens de bactérias na urina por citometria de fluxo tem potencial para oferecer informações consistentes sobre a probabilidade de uroculturas positivas. Em síntese, a análise de urina com citometria de fluxo tem potencial de quantificar marcadores para a triagem de uroculturas positivas, fornecendo ao paciente, clínico e serviço de saúde uma resposta com elevada sensibilidade e especificidade, em tempo expressivamente inferior ao resultado da urocultura convencional.

Palavras chave: urinálise, citometria de fluxo, urinálise automatizada, UF-1000i,

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are frequent pathological processes, especially in women. Laboratory confirmation of the infectious process is performed by uroculture, a laborious assay requiring 24-48 hours or more for releasing result. The oldest and routine evaluation of the urinary tract consists of the analysis of biochemical and cytological markers in a urine sample (urinalysis). The result of which can be released in less than 4 hours. In this study, which was approved by the Ethics Committee, the efficacy of bacteria, leukocytes and erythrocytes counts, flow cytometry using the UF 1000i (Sysmex) automated system, was evaluated. Two groups of laboratory records of adult individuals (> 18 years) of urinalysis were evaluated. Group 1 consists of records obtained in the usual module and Group 2 records obtained after activation of the anticarryover module. The identification and frequency of the main bacteria present in positive urocultures was also evaluated. Positive urocultures were considered as those with $\geq 10^4$ CFU/mL and negative with $< 10^4$ CFU/mL. Group 1 comprised 115,319 records with predominance of women (89%). Analyzes with ROC curve showed that bacteria and leucocytes counts have the power to identify positive urocultures. However, the erythrocyte counts presented poor discrimination. The best discriminator was bacterial count, with area above the curve (AUC) of more than 0.90 for women and men, with a cut-off value of 2,163 bacteria/ μ L and 300 bacteria/ μ L, and sensitivity >75 % and > 90%, respectively. The carryover effect of bacteria between sequential samples was also evaluated. A sample of urine with a high concentration of bacteria (1,700 to 65,800/ μ L) can transfer approximately 1.6% to 2.4% of the bacterial content to a bacteria-free solution (Blank), which represents that this sequence sample presents a false positive result for this element. For Group 2 (n = 13,572, 87% women) the records were obtained after an additional wash of the equipment after bacterial counts > 1000/ μ L to minimize carryover. In this condition the bacterial count was also the best discriminant of positive cultures, with AUC > 0.94 and sensitivity >84% and specificity >92%, superior performance to Group 1 discrimination. A subsample of Group 1 records with negative uroculture. In addition, all negative biochemical markers were used to estimate the reference interval. Other relevant findings in the study were: (i) two bacterial strains were predominant and identified in about 78% of positive cultures, *Escherichia coli* (64%) and *Streptococcus agalactiae* (14%); (ii) bacterial and leukocyte counts, analyzed by the ROC curve, can discriminate positive urocultures, and erythrocyte counts are a poor discriminator; (iii) the activation of the anticarryover module improves the discrimination of positive urocultures with the bacterial count, and its application is recommended; (iv) cut-off values for bacterial and leukocyte counts to discriminate samples with positive urocultures should consider the gender and activation of the anticarryover module; (v) the reference range for cell counts using the UF 1000i automated system (Sysmex) presented maximum values, with a 90% confidence interval, for women with bacteria <807/ μ L, leukocytes <24/ μ L and erythrocytes <22/ μ L; and for men, bacteria <271/ μ L, leukocytes <12/ μ L and erythrocytes <14/ μ L; (vi) bacterial counts in urine by flow cytometry have the potential to provide consistent information on the likelihood of positive urocultures. In summary, urine analysis with flow cytometry has the potential to quantify markers for the screening of positive urocultures, giving the patient, clinician and health service a response with high sensitivity and specificity, at a time significantly lower than the result of conventional uroculture.

Key words: urinalysis, flow cytometry, automated urinalysis, UF-1000i

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Comparações entre gênero dos elementos celulares quantificados por citometria de fluxo no sistema UF1000i no módulo “usual” (grupo 1) em uroculturas negativas.
.....30
- Figura 2. Curvas ROC para os elementos quantificados por citometria de fluxo no equipamento UF1000i no módulo “usual” (grupo 1).
.....32
- Figura 3. Efeito do carreamento de bactérias entre amostras consecutivas no sistema UF1000i na ausência do módulo anti-carreamento (grupo 2).
.....36
- Figura 4. Curvas ROC para os elementos quantificados por citometria de fluxo no equipamento UF1000i com ativação do módulo anti-carreamento (grupo 2).
.....41
- Figura 5. Comparações entre as áreas sob a curva ROC para mulheres e homens adultos quanto às células quantificadas por Citometria de fluxo (UF-1000i) no módulo usual (Grupo 1) e com ativação do módulo anti-carreamento (Grupo 2).
.....43
- Figura 6. Comparações entre os valores de corte (*cut-off*) para mulheres e homens adultos em relação às células quantificadas por Citometria de fluxo (UF1000i).
.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparativo entre estudos utilizando citometria de fluxo para discriminação de culturas de urina positivas.	09
Tabela 2. Distribuição da frequência de gêneros nas amostras do Grupo 1.	23
Tabela 3. Bactérias identificadas e suas frequências em uroculturas positivas na amostra em estudo do grupo 1.	25
Tabela 4. Características laboratoriais das amostras do Grupo 1 (módulo usual).	27
Tabela 5. Intervalo de referência para contagens celulares em indivíduos com urocultura negativa e ausência de alterações nos marcadores químicos.	34
Tabela 6. Características laboratoriais da amostra com o módulo anti-carreamento.	39
Tabela 7. Frequências das bactérias identificadas nos registros obtidos com ativação do módulo anti-carreamento de bactérias no citômetro de fluxo para o Grupo 2.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

DNA: ácido desoxido ribonucleico

EST: esterase leucocitária

HB: hemoglobina

ITU: infecção do trato urinário

LMC: Laboratório Municipal de Análises Clínicas de Curitiba

NIT: nitrito

NPV: valor preditivo negativo

PPV: valor preditivo positivo

PT: proteína

ROC: *Receiver Operator Characteristic*

SE: sensibilidade

SP: especificidade

UBA: *urine bacterium analyser*

UFC: unidade formadora de colônia

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	4
2.1 Infecções do Trato Urinário	4
2.2 Métodos de triagem	7
3. Objetivos	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. Materiais e métodos	17
4.1 Amostra.....	17
4.2 Cultura de Urina.....	17
4.2.1 Coleta da amostra.....	17
4.2.2 Critérios utilizados para a análise da cultura de urina.....	18
4.2.3 Identificação bacteriana.....	18
4.3 Exame analítico de urina.....	19
4.3.1 Determinação dos marcadores químicos.....	19
4.3.2 Determinação dos marcadores celulares.....	19
4.3.3 Análise de carreamento	21
4.4 Dados de interesse	21
4.5 Critérios de exclusão.....	22
4.6. Análises Estatísticas	22
5. Resultados e Discussão	23
5.1. Grupo 1	23
5.1.1 Cultura de urina.....	23
5.1.2 Exame analítico de urina.....	26

5.1.3 Seleção dos valores de corte para contagens celulares analisadas com o UF 1000i	30
5.2 Intervalo de referência	33
5.3 Avaliação do efeito de carreamento de bactérias entre amostras consecutivas no citômetro de fluxo	34
5.3.1. Análises do Grupo 2 (módulo anti-carreamento ativado)	37
5.3.2. Análise da discriminação de uroculturas positivas com contagens de células identificadas por citometria de fluxo no sistema UF 1000i com sistema anti-carreamento ativo	39
6. Conclusões.....	44
7. Perspectivas Futuras.....	45
8. Referências	46

1. Introdução

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comuns em pacientes ambulatoriais e também nos hospitalizados. As mulheres são mais propensas ao desenvolvimento de ITU que os homens. Estima-se que uma em cada 3 mulheres apresente ITU ao menos uma vez durante a vida (FOXMAN, 2010; FOXMAN *et al.*, 2000; JOLKKONEN *et al.*, 2010; LEE; NEILD, 2007; MOSHAVER *et al.*, 2016). As ITUs são classificadas conforme o local da infecção, como cistite quando acometem a bexiga ou pielonefrite quando atingem os rins (FOXMAN, 2010). As ITUs podem ser sintomáticas ou assintomáticas e os sintomas mais comuns são disúria e aumento da frequência de micção, podendo haver hematúria e dor lombar (FOXMAN, 2003; LEE; NEILD, 2007). Pacientes com bacteriúria assintomática possuem risco maior de evolução para pielonefrite e complicações (FOXMAN, 2003; LEE; NEILD, 2007). Em gestantes, a bacteriúria assintomática aumenta o risco de retardo no desenvolvimento intrauterino e criança com baixo peso ao nascer (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000).

A presença de bactérias em contagem significativa na urina caracteriza a ITU (LEE; NEILD, 2007). Vários critérios são utilizados para definir bacteriúria significativa, que classicamente é definida pela presença de $\geq 10^5$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) em urina recém-emitada, embora infecções sintomáticas possam ocorrer com contagens de 10^3 UFC/mL (LEE; NEILD, 2007; PEZZLO, MARIE, 2014). No entanto, isoladamente, a presença de bactérias na urina não deve ser o único marcador considerado para o diagnóstico de ITU, pois a bacteriúria pode ser decorrente de colonização ou contaminação bacteriana, bem como infecção (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; KUBIK; MCCARTER, 2012). Outros elementos presentes na urina como leucócitos e esterase leucocitária contribuem para diferenciar ITU de colonização e contaminação por detectar a reação inflamatória no paciente (JOLKKONEN *et al.*, 2010; MANONI *et al.*, 2009; SHINE *et al.*, 2007).

A cultura de urina é considerada o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de ITU, possibilita a identificação do agente etiológico da infecção e permite a realização do teste de susceptibilidade para orientação na terapia com

antibióticos. Porém, a urocultura é um teste laborioso, de custo elevado, com resultados liberados em média de 24 a 48 horas após a coleta. Os resultados reportados são negativos em 50 a 80% das amostras recebidas nos laboratórios de microbiologia. O uso prévio de antibióticos e higiene inadequada antes da coleta são fatores que interferem na qualidade dos resultados (BROEREN *et al.*, 2011; DEVILLÉ *et al.*, 2004; FENWICK; BRIGGS; HAWKE, 2000; JOLKKONEN *et al.*, 2010; MOSHAVER *et al.*, 2016). Por isso, na prática clínica, é defendido o tratamento empírico com antibióticos antes de se conhecer o resultado da cultura. Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos está relacionado ao aumento da resistência bacteriana (FAHEY *et al.*, 2003; FENWICK; BRIGGS; HAWKE, 2000; LITTLE *et al.*, 2006; ST JOHN *et al.*, 2006).

Desta forma, um método de triagem rápido, capaz de detectar amostras negativas antes da realização da urocultura, possibilitaria uma redução no volume de trabalho, redução de custos no laboratório de microbiologia e liberação de resultados negativos em menor tempo, contribuindo para a redução do uso indiscriminado de antibióticos (BROEREN *et al.*, 2011; FAHEY *et al.*, 2003; JOLKKONEN *et al.*, 2010; OKADA, H. *et al.*, 2000; ST JOHN *et al.*, 2006; ZAMAN; ROGGEMAN; VERHAEGEN, 2001).

A triagem de amostras tem sido aplicada em vários estudos com base principalmente em dados do exame analítico de urina, que compreende a análise química dos elementos solúveis e a verificação dos elementos dispersos na urina (CHIEN *et al.*, 2007; PEZZLO, M. T. *et al.*, 1992). A triagem pela análise microscópica do sedimento urinário quantificando a presença de leucócitos, e de bactérias pela coloração de Gram, é eficaz na detecção de ITU. Contudo, são métodos trabalhosos, demorados e que apresentam variação entre os observadores (LANGLOIS *et al.*, 1999; MOSHAVER *et al.*, 2016; SHINE *et al.*, 2007). Tiras reativas para a detecção de esterase leucocitária (EST) e nitrito (NIT) tem sensibilidade e especificidade baixas não sendo recomendados como método isolado para triagem (DEVILLÉ *et al.*, 2004; PFALLER; KOONTZ, 1985; SEMENIUK; CHURCH, 1999).

Os citômetros de fluxo, que vêm sendo utilizados em laboratórios clínicos para a análise dos elementos particulados na urina, podem ser uma ferramenta valiosa para a triagem de amostras com culturas negativas. Os citômetros de

fluxo UF-50 e UF-100 (Sysmex) destacaram-se de outros métodos pela rapidez na obtenção das contagens celulares e pela boa reprodutibilidade. No entanto, em relação a sua aplicação na triagem de amostras, os estudos realizados obtiveram resultados divergentes com grande número de amostras com resultados falsos negativos e baixas sensibilidade e especificidade (MANONI, F *et al.*, 2010; OKADA, H. *et al.*, 2000; ZAMAN; ROGGEMAN; VERHAEGEN, 2001).

Os citômetros de fluxo UF-500i e UF-1000i (Sysmex) possuem como diferencial um corante fluorescente de polimetina para coloração do DNA bacteriano, conferindo maior sensibilidade e especificidade à detecção e quantificação de bactérias presentes nas amostras de urina e minimizando os falsos positivos pela ausência de interferência quando da presença de cristais ou outros elementos presentes na amostra (BROEREN *et al.*, 2011; JOLKKONEN *et al.*, 2010; MANONI, FABIO *et al.*, 2009).

Um método adequado para utilização na triagem de culturas de urina deve possuir sensibilidade e valor preditivo negativo superior a 95% para minimizar o risco de resultados falso negativos, além de apresentar boa reprodutibilidade e tempo reduzido de análise (JOLKKONEN *et al.*, 2010; KELLOGG *et al.*, 1987; MOSHAVER *et al.*, 2016).

O objetivo deste estudo é comparar parâmetros do exame analítico de urina, com ênfase no desempenho do citômetro de fluxo UF-1000i, frente aos resultados da cultura de urina, e estabelecer valores de corte para a triagem de amostras que apresentem cultura de urina positivas.

2. Revisão de literatura

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas mais comuns em humanos (SCHMIEMANN *et al.*, 2010; SHIEN; ALONTO, 2011; WILSON; GAIDO, 2004). Muitas vezes representam um desafio porque nem sempre o seu diagnóstico é direto, e devem ser diferenciadas de outras doenças que tem apresentação clínica similar. Algumas ITU são assintomáticas ou se apresentam com sinais e sintomas atípicos, e o diagnóstico das ITU em pacientes neutropênicos pode requerer critérios diagnósticos diferentes daqueles utilizados em geral (WILSON; GAIDO, 2004).

2.1 Infecções do Trato Urinário

As ITUs caracterizam-se pela presença de bactérias na urina (bacteriúria) em concentração significativa. A definição de bacteriúria significativa varia, mas classicamente corresponde à presença de bactérias na concentração $\geq 10^5$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Contudo, podem ocorrer infecções sintomáticas com o patógeno em concentração de 10^3 UFC/mL (KUBIK; MCCARTER, 2012; PEZZLO, MARIE, 2014; SCHMIEMANN *et al.*, 2010).

A prevalência das ITU é altamente dependente da idade e do sexo (LINHARES *et al.*, 2013; SCHMIEMANN *et al.*, 2010). Durante o período neonatal cerca de 1% das crianças apresenta bacteriúria, a incidência é mais elevada nos meninos e frequentemente ocorre bacteremia. No entanto, nos homens, até cerca de 60 anos, a incidência de ITU é extremamente baixa e, quando ocorre, frequentemente está associada com anormalidades anatômicas, doenças prostáticas e a consequente instrumentação como a cateterização (KOEIJERS *et al.*, 2010; LEE; NEILD, 2007; LIPSKY, 1999; SHIEN; ALONTO, 2011).

As ITU ocorrem mais frequentemente em mulheres que nos homens; aproximadamente metade delas desenvolve ITU ao longo da vida. A maior suscetibilidade das mulheres ao desenvolvimento de ITU está associada com o fato de apresentarem uretra mais curta e a proximidade desta com a região perianal. A presença de bacteriúria assintomática ocorre em cerca de 1-2% das

meninas com idade entre 4 e 12 anos e de 3-5% das mulheres (FOXMAN, 2010). Infecções sintomáticas são raras antes de 13 anos de idade, porém a incidência aumenta durante a adolescência (BENT; SIMEL; FIHN, 2013; DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; FAHEY *et al.*, 2003; LEE; NEILD, 2007; SHIEN; ALONTO, 2011).

Outros grupos de risco para o desenvolvimento de ITU incluem os idosos, mulheres grávidas, pacientes com cateteres ou anormalidades do trato genitourinário (NICOLLE, 2001; SCHMIEMANN *et al.*, 2010; SHIEN; ALONTO, 2011).

Entre as pessoas idosas, a incidência das ITU aumenta em ambos os sexos (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000). A incidência aumentada nos homens geralmente decorre de condições como hipertrofia da próstata e da perda da atividade bactericida das secreções prostáticas. Nas mulheres o prolapso da bexiga contribui para a ocorrência da infecção. Em ambos os sexos, doença neuromuscular e cateterização da bexiga são fatores que contribuem para o aumento da incidência de ITU (LIPSKY, 1999; NICOLLE, 2001; SHIEN; ALONTO, 2011).

A incidência de bacteriúria nas mulheres grávidas é discretamente mais elevada do que entre as não-grávidas. UTI é uma das complicações mais comuns durante a gravidez. Isto está relacionado às alterações fisiológicas e estruturais do trato urinário durante a gravidez (DEMILIE *et al.*, 2014; GLASER; SCHAEFFER, 2015; RAJARATNAM *et al.*, 2014). As alterações podem ser devido aos elevados níveis de progesterona circulantes, à compressão do útero aumentado sobre a bexiga, aumentando a pressão intravesical, o que pode resultar em refluxo vesico-ureteral e retenção da urina na bexiga após a micção (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; DEMILIE *et al.*, 2014; GLASER; SCHAEFFER, 2015). Estas alterações criam condições favoráveis ao desenvolvimento bacteriano e infecções ascendentes a partir da uretra. Outros fatores predisponentes incluem alterações bioquímicas da urina, específicas da gestação, como concentração aumentada de glucose, aminoácidos e produtos de degradação de hormônios, com elevação do pH urinário. As consequências da ITU nas gestantes são mais severas, com risco de complicações para a mãe e a criança, tais como risco maior para progressão para pielonefrite, possível risco elevado para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, parto prematuro e

criança com baixo peso ao nascer (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; DERESE *et al.*, 2016; MATUSZKIEWICZ-ROWIŃSKA; MAŁYSZKO; WIELICZKO, 2015; OLADEINDE; OMOREGIE; OLADEINDE, 2015).

O acesso das bactérias ao trato urinário ocorre através da via ascendente, através da colonização da uretra e daí atingindo a bexiga, ou pela via hematogênica. Comumente, a origem da bacteriúria é via uretra, mas pode ocorrer, raramente, através do sangue (CHUNG; ARIANAYAGAM; RASHID, 2010).

Clinicamente, as ITU são classificadas como complicadas ou não-complicadas. As últimas tipicamente afetam indivíduos saudáveis, exceto pela ITU, e que não apresentam anormalidades estruturais ou neurológicas do trato urinário. As ITU complicadas estão associadas com fatores que comprometem o trato urinário ou as defesas do hospedeiro, incluído obstrução urinária, retenção urinária causada por doença neurológica, imunossupressão, insuficiência renal, entre outras (FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, em pacientes ambulatoriais, as ITU são não complicadas, porém podem ocorrer complicações como pielonefrite, prostatite e até septicemia (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; FOXMAN, 2010; LEE; NEILD, 2007).

Os agentes etiológicos de ITU incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas. Bactérias entéricas tem sido, e permanecem como as mais frequentes causas de ITU, em particular *Escherichia coli*, o uropatógeno mais comum (Wilson e Gaido, 2004). Entre os pacientes ambulatoriais outros agentes comuns de UTI incluem espécies de *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* embora outras bactérias também possam causar este tipo de infecção (LINHARES *et al.*, 2013; PEZZLO, MARIE, 2014; WILSON; GAIDO, 2004).

O padrão ouro para o diagnóstico laboratorial das infecções urinárias é a cultura de urina, geralmente obtida pela coleta, por micção espontânea, do jato médio após a higiene da região urogenital, e inóculo em meios de cultivo apropriados. Contudo, como o resultado da cultura de urina é liberado entre 1 a 3 dias após a chegada das amostras ao laboratório, muitos médicos iniciam tratamento empírico com antibióticos sem evidência laboratorial de suporte, mesmo considerando que em até 80% das amostras recebidas no laboratório, não ocorre desenvolvimento bacteriano *in vitro*. Conseqüentemente, um grande número de pacientes pode receber terapia antimicrobiana desnecessária,

aumentando custos com tratamento e favorecendo o aumento de resistência bacteriana (FAHEY *et al.*, 2003; IVANČIĆ *et al.*, 2008; LITTLE *et al.*, 2006; ST JOHN *et al.*, 2006).

2.2 Métodos de triagem

Muitos métodos de rastreio de amostras negativas na cultura de urina foram relatados anteriormente por diversos autores, incluindo análise semi-quantitativa de proteínas totais, hemoglobina, leucócito esterase e nitrito redutase, em teste rápido por tira reativa. Métodos esses que sofrem com falta de exatidão e precisão (BURD; KEHL, 2011; PFALLER; KOONTZ, 1985).

Patel e colaboradores compararam os resultados de 1076 culturas de urina com combinações dos resultados de proteína, nitrito, hemoglobina e leucócito esterase determinados através de tira reativa (Multistix 8SG; Bayer Diagnostics) com leitura automatizada no equipamento Clinitek 50 (Bayer Diagnostics). Consideraram como cultura positiva amostras com desenvolvimento de bactérias com contagem $>10^5$ UFC/mL, ou entre 10^4 - 10^5 UFC/mL em caso de isolamento de Gram negativos. Os quatro marcadores combinados resultaram em sensibilidade (SE) e valor preditivo negativo (NPV) de 98,3% permitindo exclusão de 16,3% das culturas de urina. A combinação entre esteráse leucocitária, nitrito e proteína obteve NPV de 98,0%, SE de 96,7%, que permitiu exclusão de 28,2%. A combinação dos marcadores esteráse leucocitária e nitrito apresentou SE de 90,6% (PATEL *et al.*, 2005).

Vários estudos foram realizados comparando resultados obtidos em citômetros de fluxo com o da cultura de urina. Destaca-se a utilização dos citômetros UF-50 e 100; UF-500 e 1000i. A principal diferença entre os citômetros de fluxo UF-50 e UF-100 para os citômetros UF-500 e UF-1000 é que os primeiros realizam a contagem de bactérias no mesmo ciclo que é realizada a contagem de células eucarióticas eventualmente presentes na amostra. A presença de cristais amorfos e restos celulares interferem na contagem de bactérias. Enquanto que UF-500i e UF-1000i a contagem de bactérias é realizada em ciclo independente com reagentes e corantes específicos o que confere maior especificidade na contagem de bactérias sem interferência de

partículas não bacterianas (KOKEN *et al.*, 2002; LE *et al.*, 2016; MARSCHAL *et al.*, 2012; MONSEN; RYDÉN, 2015; OTTIGER; SCHAER; HUBER, 2007).

Em estudos comparativos entre cultura de urina e resultados obtidos com a primeira geração de citômetros de fluxo, para a exclusão de amostras sem contagem significativa de espécies bacterianas, Okada e colaboradores (2000) avaliaram o desempenho do equipamento UF-50. Foram consideradas como positivas culturas com contagem de colônias $\geq 10^5$ UFC/mL e com desenvolvimento de apenas um uropatógeno ou com claro predomínio de uma única espécie em contagem superior a 10^4 UFC/mL. Para o citômetro, foi considerado amostra positiva quando esta apresentou número significativo de bactérias, baseado na intensidade de luz dispersa (acima de 12 unidades referenciais de luz no UF-50), associada a contagem de leucócitos >5 células/mL. A sensibilidade apresentada foi de 83,1%; especificidade de 76,4%; valor preditivo positivo de 62% e valor preditivo negativo de 90,75%. No mesmo estudo, com base nos critérios estabelecidos, o método apresentou 30 resultados falso positivos (16,1%), onde 18 amostras apresentaram desenvolvimento de bactérias com contagem entre $1,4 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^3$; e oito destes pacientes estavam em tratamento com antibióticos o que pode impedir o desenvolvimento *in vitro* de bactérias. Nas outras amostras, existia presença de células epiteliais, leucócitos e detritos que podem resultar em contagem de bactérias, pois esta geração de citômetro não dispõe de câmara exclusiva para contagem de bactérias e estas são quantificadas na mesma câmara que os outros elementos (OKADA *et al.*, 2000).

Tabela 1. Comparativo entre estudos utilizando citometria de fluxo para discriminação de culturas de urina positivas.

N	Cultura positiva (UFC/mL)	AUC	Cutoffs utilizados	SE (%)	Amostras triadas (%)	Referências
UF-50						
186	$\geq 10^4$	ND	>5 leucócitos/ μ L	83,1	57,2	Okada <i>et al</i> 2000
UF-100						
330	$\geq 10^3$	0,93	3000 bactérias/ μ L	94,4	23,0	Shine <i>et al</i> 2007
554	$\geq 10^4$	ND	1000 bactérias/ μ L	55,3	30,5	Zaman <i>et al</i> 2001
“UBA”						
273	$\geq 10^4$	ND	10 bactérias/ μ L	96,6	63,4	Okada <i>et al</i> 2006
UF-500i						
1094	$\geq 10^3$	0,94	758 bactérias/ μ L	93,4	64,5	Jolkkonen <i>et al</i> 2010
UF-1000i						
703	$\geq 10^4$	ND	65 bactérias/mL e 100 leucócitos/mL	98,2	43,5	Pieretti <i>et al</i> 2010
1577	$\geq 10^4$	0,91	39	95,0	28,0	Broeren <i>et al</i> 2011
	$\geq 10^5$	0,96	230 bactérias/ μ L		52,0	
1349	$\geq 10^5$	0,96	20	99,1	32,6	De Rosa <i>et al</i> 2010
			170	94,4	60,0	
			265	95,1	64,5	
			440 bactérias/ μ L	91,3	69,5	
1463	$\geq 10^5$	ND	125 bactérias/ μ L	97,0	62,7	Manoni <i>et al</i> 2009
791	$\geq 10^4$	0,95	288,9 bactérias/ μ L	93,0		Giesen <i>et al</i> 2013
			31,8 leucócitos/ μ L	89,0		
Accuri C6 (BD biosciences, USA)						
209	$\geq 10^3$	0,86		79,0	36,3	Moshaver <i>et al</i> 2016
	$\geq 10^4$	0,89	1000 bactérias/ μ L	90,0		
	$\geq 10^5$	0,96		99,0		

N, tamanho amostral

AUC, Area Under the Curve (área sob a curva)

SE - sensibilidade; ND - dado não disponível;

UBA - citômetro de fluxo que realiza a contagem de bactérias separadamente das outras células existentes na amostra.

Shine e colaboradores (2007) realizaram estudo com 330 amostras de pacientes ambulatoriais, considerando como positiva cultura com contagem de colônias $\geq 10^3$ UFC/mL. Foram consideradas positivas 66 amostras, com desenvolvimento de *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida* sp. As amostras foram submetidas ao analisador UF-100 e considerando a contagem de bactérias do equipamento com valor de corte de 3000/ μ L a sensibilidade foi de 94,4% e valor preditivo negativo de 97,9%, para as amostras positivas submetidas a cultura de urina. Este valor de corte permitiu excluir 23,0% do total de culturas (SHINE *et al.*, 2007).

Outro estudo que avaliou o desempenho do equipamento UF-100 (ZAMAN; ROGGEMAN; VERHAEGEN, 2001) o melhor valor preditivo negativo encontrado foi de 87,5% considerando as contagens de 1000 bactérias/ μ L e ≥ 20 leucócitos/ μ L. Para o resultado das culturas de urina, foi considerado positivo para contagens superiores a 10^4 UFC/mL ou, em caso de gestantes ou pacientes sintomáticos, 10^3 UFC/mL. Foram encontrados 24 (4,3%) resultados falsos negativos na citometria, destes resultados falso negativos, três amostras eram de pacientes de transplante renal com infecção por *Enterococcus* sp., três pacientes ambulatoriais com sintomas de ITU, dois pacientes leucêmicos com ITU e um paciente em unidade de terapia intensiva.

Assim, é necessário um método de rastreio rápido, de execução simples e confiável para evitar que um grande número de amostras de urina, sem contagem significativa de um agente patogênico, seja submetido à cultura de urina (KADKHODA *et al.*, 2011). Recomenda-se que para triagem de amostras negativas para cultura, deve-se buscar método com baixo índice de falso negativo e sensibilidade entre 90-95% (ASPEVALL *et al.*, 2001).

Métodos de automação em urinálise desenvolvidos mais recentemente permitem detecção de baixos níveis de bacteriúria, possibilitando a padronização da triagem de amostras de urina para cultura. O equipamento UF-1000i possui detectores e reativos independentes para a coloração do DNA bacteriano e dos

elementos não bacterianos, proporcionando sensibilidade e especificidade adequados para predição do resultado da cultura de urina (GIESEN *et al.*, 2013).

Okada e colaboradores (2006) avaliaram o desempenho de um citômetro de fluxo, denominado de *urine bacterium analyser* (UBA) que realiza a detecção de bactérias através de coloração fluorescente do ácido nucléico bacteriano em detector independente. Foram analisadas 273 amostras de urina considerando como positivas as culturas com contagem de colônias $\geq 10^5$ UFC/mL, entre 10^4 - 10^5 UFC/mL e desenvolvimento de um tipo bacteriano, e ainda contagem $\geq 10^4$ UFC/mL de duas ou mais espécies com predomínio (contagem 10 vezes maior) de espécie potencialmente patogênica. Para o citômetro de fluxo, a contagem de 10^4 bactérias/ μ L foi considerada significativa e a sensibilidade encontrada foi de 96,6%, a especificidade 79,7%, valor preditivo positivo 57%, valor preditivo negativo de 98,8%. Resultados falso positivos foram observados para 15,8% e falsos negativos para 0,7% das amostras. Nos resultados falsos positivos no citômetro UBA, as amostras foram verificadas por microscopia e a presença de bactérias foi confirmada, com contagem estimada entre 10^4 e 10^5 UFC/mL (OKADA, HIROSHI *et al.*, 2006).

No mesmo estudo também foi avaliado o coeficiente de variação entre a cultura de urina e citometria de fluxo, realizando 10 repetições utilizando estirpes bacterianas da coleção *American Type Culture Collection* (*E. coli* ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29121, e *S. aureus* ATCC 29213). Para suspensões bacterianas preparadas em solução fisiológica na concentração de 10^4 UFC/mL, o coeficiente de variação ficou entre 9,3% e 18,4% para o citômetro UBA e entre 21,1% e 63,8% para a cultura de urina. Reduzindo a concentração da suspensão em solução fisiológica para 10^3 UFC/mL, o coeficiente de variação no citômetro foi de 27,8% a 35,1% e para cultura de urina foi de 38,95 a 83,4%. Durante o estudo, foi analisado paralelamente o controle de qualidade do equipamento, com amostra de controle de qualidade com partículas de látex XPR-652 (Duke Scientific Co., CA) que mimetizam tamanho de uma bactéria, em 18 diferentes dias e o coeficiente de variação encontrado para o controle de qualidade foi menor que 1,5%.

Jolkkonen e colaboradores (2010) avaliaram o desempenho do citômetro de fluxo UF-500i frente a 1094 amostras de urina. Foram consideradas como

negativas as amostras cujo crescimento bacteriano foi $\leq 10^3$ UFC/mL. O desenvolvimento $>10^3$ UFC/mL foi considerado positivo para pacientes com sintomas de infecção do trato urinário; com retenção urinária menor que 4 horas; sexo masculino e em uso de cateter. Para os demais pacientes, o desenvolvimento $>10^4$ UFC/mL foi considerado positivo para infecção do trato urinário. Em 648 (59,2%) amostras não foi observado desenvolvimento bacteriano; e em 262 (23,9%) o desenvolvimento observado não foi considerado significativo. Os parâmetros considerados na citometria de fluxo foram contagem de bactérias e leucócitos e os valores de corte considerados variaram conforme faixa etária e sexo do paciente. Os valores de corte para leucócitos foram 10-17 células/ μ L e para bactérias, 41 células/ μ L para crianças e 758 células/ μ L para mulheres. A sensibilidade verificada foi de 93,4%; especificidade 82,3%; valor preditivo negativo 98,3%. No estudo, foram observados 172 (18,1%) casos falsos positivos para cultura, mas essas amostras de urina apresentaram elevada contagem de bactérias e leucócitos. Neste estudo a redução do número de culturas a serem realizadas corresponde a 64,5% (JOLKKONEN *et al.*, 2010).

Pieretti e colaboradores (2010) analisaram amostras de 703 pacientes entre os quais 128 estavam hospitalizados e 575 não hospitalizados. As amostras foram analisadas 2 horas após a coleta, e foi considerado como resultado de cultura positiva amostras com contagem $\geq 10^4$ UFC/mL. Os valores de corte estabelecidos para o citômetro de fluxo UF-1000i foram de 65 bactérias/ μ L e 100 leucócitos/ μ L. Com base nos resultados obtidos, para o diagnóstico de infecção do trato urinário o equipamento apresentou sensibilidade de 98,2%, especificidade de 62,1%, valor preditivo negativo de 98,7%, valor preditivo positivo de 53,7% e acurácia de 73,3%. Com este desempenho, o citômetro de fluxo reduziu a necessidade de realização de culturas de urina em 43% (PIERETTI *et al.*, 2010).

Em outro estudo realizado com o citômetro UF-1000i (BROEREN *et al.*, 2011), no qual foram analisadas amostras de 1577 pacientes (896 pacientes hospitalizados e 681 não hospitalizados). Foi observado que o critério utilizado para considerar resultado de cultura negativa reflete diretamente no percentual de exclusão de culturas negativas e nos valores de corte para contagem de bactérias do exame analítico de urina no citômetro UF-1000i. Se o valor de referência para cultura negativa for ausência de crescimento bacteriano, o valor

de corte no citômetro seria de 26 bactérias/ μL , e sensibilidade de 95%, permitindo reduzir em 20% o número de amostras negativas que não seriam inoculadas. Se o valor de referência para cultura negativa for de desenvolvimento $<10^4$ UFC/mL, com a mesma sensibilidade, o valor de corte seria de 39 bactérias/ μL na citometria, com redução de 28% no número de culturas a serem realizadas. Considerando cultura negativa o desenvolvimento $<10^5$ UFC/mL, o valor de corte para bactérias é de 230 bactérias/ μL , com redução de 52% do número de culturas. A triagem de amostras negativas deve ser conduzida de forma a apresentar sensibilidade e valor preditivo negativo elevados, minimizando o risco de resultados falso negativos. Pacientes com risco elevado como crianças, gestantes e idosos precisam de valores de corte diferentes dos demais pacientes.

Utilizando resultados de contagem de leucócitos e de bactérias realizadas também no citômetro de fluxo UF-1000i frente aos resultados da cultura de urina de 1349 pacientes, de 0 a 98 anos de idade, de ambos os sexos, hospitalizados e da comunidade, De Rosa e colaboradores (2010) observaram que do total, 346 amostras foram consideradas positivas na cultura, com desenvolvimento superior a 10^5 UFC/mL. O desempenho da citometria de fluxo para contagem de bactérias, considerando os quatro valores de corte de (1) 20; (2) 170; (3) 265 e (4) 440 bactérias/ μL , apresentou respectivamente sensibilidade (%) de 99,1; 97,4; 95,1 e 91,3 e valor preditivo negativo (NPV,%) de 99,3; 98,9; 98,0 e 96,8. Considerando o desempenho do equipamento para a triagem das amostras negativas, o UF-1000i reportou como amostras negativas (não submetidas a cultura), para os respectivos valores de corte, as porcentagens de (1) 32,6%; (2) 60,0%; (3) 64,5% e (4) 69,5%. No entanto, entre as amostras com resultado positivo pelo UF-1000i, foi reportado com negativos na cultura as porcentagens de (1) 41,95%; (2) 15,0%; (3) 11,1% e (4) 7,0%. A discordância destes resultados positivos na triagem e negativos na cultura é, possivelmente, devido à presença de bactérias não viáveis na urina, após tratamento com antibióticos, ou a baixa concentração de bactérias na amostra (DE ROSA *et al.*, 2010). De acordo com o mesmo estudo, a automação UF-1000i tem potencial de excluir, com sensibilidade superior a 95%, entre 32,6 e 64,5% das amostras negativas para cultura, no mesmo dia, melhorando a qualidade no atendimento aos pacientes,

evitando tratamento desnecessário com antibióticos; reduzindo custos e a resistência aos antimicrobianos.

Manoni e colaboradores (2009) compararam o resultado de 1463 amostras, de pacientes adultos com suspeita de infecção do trato urinário, utilizando os resultados de leucócitos e bactérias obtidos no equipamento UF-1000i, com o objetivo de determinar valores de corte para decisão de realizar ou não a cultura de urina. Segundo os autores, o melhor valor de corte obtido para bactérias em curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*) foi 125 bactérias/ μL apresentando sensibilidade (SE) 0,97; especificidade (SP) 0,94; PPV 0,92 e NPV 0,98. Com este valor de corte experimental, foram encontrados 532 resultados positivos (36,36%); 49 falsos-positivos (3,35%); 868 negativos (59,33%) e 14 falsos-negativos (0,96%). Entre os resultados falsos-positivos, em 13 amostras foi detectada a presença de antibióticos, significando que o UF-1000i quantificou bactérias não viáveis. Em outras 29 amostras com resultados falsos positivos, houve desenvolvimento de várias espécies bacterianas. Para este grupo, a contagem do citômetro foi correta, porém o resultado qualitativo foi colonização ou contaminação (MANONI, FABIO *et al.*, 2009).

O valor de corte ótimo para leucócitos foi de 40 células/ μL , e considerando na cultura o desenvolvimento de 10^5 UFC/mL como positivo. Este valor de corte isoladamente não apresentou SE e NPV satisfatórios (SE 0,87; SP 0,79; PPV 0,72 e NPV 0,92). Considerando valores de corte de leucócitos e bactérias simultaneamente, a SE foi 0,99; SP 0,77; PPV 0,82 e NPV 0,98. A contagem de bactérias de 10^5 UFC/mL está fortemente associada com diagnóstico de infecção do trato urinário, contudo considerar a presença de piúria é importante para diferenciar infecção do trato urinário de colonização e contaminação (MANONI, FABIO *et al.*, 2009).

Estes dados reportados indicam que o citômetro de fluxo UF-1000i, apresenta potencial para utilização na triagem de amostras de urina. No entanto, valores de corte devem ser estabelecidos em cada laboratório comparando aos resultados reportados na cultura de urina.

3. Objetivos

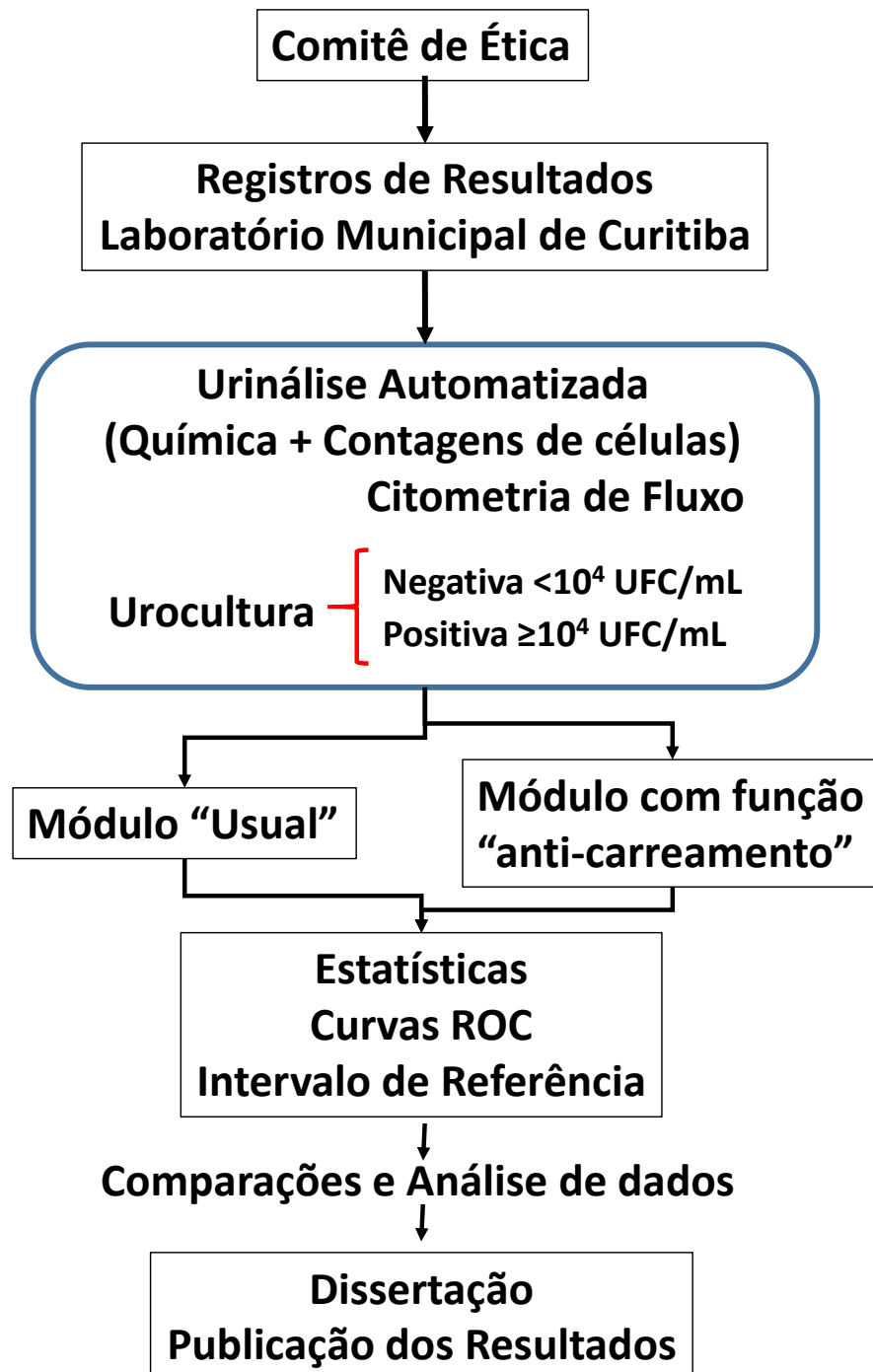
3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da citometria de fluxo na identificação e quantificação de células na urina, como preditores de culturas de urina positivas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as frequências das principais espécies bacterianas associadas a uroculturas positivas na amostra em estudo;
- Identificar o potencial das contagens celulares de eritrócitos, leucócitos e bactérias na urina, quantificados no sistema automatizado de citometria de fluxo UF-1000i (Sysmex) como preditores de urocultura positiva;
- Definir valores de corte dos parâmetros avaliados na urina na busca de critérios para triagem urina positivas na urocultura;
- Avaliar o efeito do carreamento de bactérias entre amostras sequenciais (“carryover”) no sistema de citometria de fluxo UF-1000i (Sysmex);
- Propor intervalo de referência para as contagens de eritrócitos, leucócitos e bactérias para a população brasileira.

O fluxograma abaixo mostra as principais etapas propostas para a pesquisa em tela.



Fluxograma das principais etapas do projeto de pesquisa.

4. Materiais e métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (CAAE: 50686015.5.0000.0102) e no comitê de ética da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba (CAAE: 50686015.5.3001.0101).

4.1 Amostra

Foram analisados os resultados de cultura de urina e do exame analítico de urina (urinálise) de pacientes ambulatoriais, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, realizados no Laboratório Municipal de Análises Clínicas de Curitiba (LMC) no período de 05 de janeiro de 2015 a 10 de outubro de 2016. Todas as amostras consideradas neste trabalho foram analisadas concomitantemente para urocultura e exame analítico de urina.

4.2 Cultura de Urina

4.2.1 Coleta da amostra.

As amostras foram obtidas por micção espontânea; após a higiene da região urogenital o jato médio da primeira urina da manhã foi coletado em frasco seco estéril. As amostras foram transferidas para tubo cônico estéril com capacidade de 12 mL, sem conservantes, e entregues às Unidades de Saúde onde foram identificadas com etiquetas contendo nome do paciente e código de barras. As amostras foram armazenadas sob refrigeração entre 2-8°C e transportadas nestas condições ao laboratório para posterior processamento.

Urocultura. A cultura de urina foi realizada em meio cromogênico CPS-ID3 (BioMérieux). O sistema de automação Previ-Isola (BioMérieux) foi utilizado para realizar o inóculo de 1µL da amostra e efetuar a rotulação das placas, identificando os pacientes por código de barras para permitir o rastreamento das amostras inoculadas nos meios de cultura. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 18-24 horas à 37°C. Após este período os meios de cultura

foram inspecionados para verificar se houve desenvolvimento bacteriano e, neste caso, realizar a contagem de colônias.

4.2.2 Critérios utilizados para a análise da cultura de urina.

Neste estudo foi considerado como resultado positivo na cultura de urina o desenvolvimento de um único tipo de colônia (uma espécie bacteriana) com contagem $\geq 10^4$ UFC/mL (maior ou igual a 10.000 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro), ou no caso de duas espécies diferentes de bactérias, aquela predominante e com contagem $> 10^4$ UFC/mL. Amostras com ausência de desenvolvimento de colônias, ou com crescimento inferior 10^4 UFC/mL, foram consideradas negativas. Amostras com desenvolvimento de três ou mais espécies bacterianas foram consideradas como contaminadas e excluídas do estudo.

4.2.3 Identificação bacteriana.

Para as amostras consideradas como positivas, a etapa seguinte é a identificação das bactérias uropatogênicas. O meio cromogênico CPS ID3 permite a identificação direta de *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., e *Streptococcus agalactiae* com base na morfologia colonial e coloração típica devido à utilização de uma base rica que combina peptonas e dois substratos cromogênicos diferentes para detecção de atividades enzimáticas específicas (β -glucuronidase e β -glucosidase) (PAYNE; ROSCOE, 2015; PERRY *et al.*, 2006). Para bactérias com resultados indefinido, ou para aquelas sem identificação com o meio CPS ID3, a identificação bacteriana foi realizada através do sistema automatizado Phoenix (Becton, Dickinson and Company). Em casos de dúvida, para *Streptococcus agalactiae* foi realizada a identificação complementar pelo teste CAMP.

O teste CAMP, descrito em 1944 por Christie, Atkins, and Munch-Peterson, consiste em inocular uma cepa padrão de *Staphylococcus* beta hemolítico (*Staphylococcus aureus*) em ágar sangue de carneiro 5%. Perpendicular a esta e a 1 centímetro de distância desta cepa beta hemolítica, inocula-se a cepa teste. A difusão no meio de cultivo de uma proteína conhecida

como fator CAMP, produzida pelos *Streptococcus* do grupo B, atua em conjunto com a beta lisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* e produzem hemólise característica em forma de seta, identificando presuntivamente o *Streptococcus agalactiae* (DARLING, 1975).

4.3 Exame analítico de urina

Após a inoculação no meio de cultivo, as amostras de urina foram enviadas ao setor de urinálise para análise química dos elementos solúveis e dispersos nas amostras. As amostras não sofreram nenhum pré-processamento.

4.3.1 Determinação dos marcadores químicos.

Esta análise foi realizada com o sistema de automação Urisys 2400 (Roche Diagnostics). Este equipamento realiza a homogeneização das amostras e então aspira 1,5 ml de urina para a determinação da densidade por refratometria; com o auxílio de tiras reativas faz a determinação semi-quantitativa dos analitos (pH, glicose, bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, hemoglobina, esterase leucocitária, proteína e nitrito) em fotômetro de refletância em três comprimentos de onda diferentes (470nm, 555nm e 620nm). A tira reativa possui áreas de branco e área compensadora para descontar coloração inicial da amostra.

Os resultados “positivos” para os biomarcadores foram determinados com base na literatura, classicamente pela associação destes a processos patológicos ou a alterações na fisiologia basal.

4.3.2 Determinação dos marcadores celulares.

Para a análise dos elementos dispersos na urina foi utilizado o citômetro de fluxo UF-1000i (Sysmex). O equipamento realiza automaticamente a homogeneização das amostras e aspira 800 µL da urina para a análise. No interior do equipamento a amostra é dividida em duas alíquotas, uma para contagem de bactérias e outra para contagem dos demais elementos dispersos. As contagens são realizadas com auxílio de dois corantes polimetina fluorescentes específicos. Para a contagem de bactérias apenas o DNA

bacteriano é corado pela polimetina 0,01% (UF II *SEARCH*[®]-BAC); as células eucarióticas contendo DNA são coradas pela polimetina 0,03% (UF II *SEARCH*[®]-SED). Os elementos não celulares e as células procarióticas e eucarióticas, são carregadas por condutometria de focalização hidrodinâmica, em que a velocidade maior no fluxo do diluente centraliza partículas da amostra para individualizá-las e alinhá-las à lente do feixe laser, pela câmara de fluxo, em etapas diferentes para cada alíquota, onde são irradiadas por feixe de semicondutor laser vermelho de 635nm. A detecção da luz de dispersão direta fornece informações sobre o tamanho da partícula; a luz de dispersão lateral fornece informações sobre a complexidade das partículas enquanto que a fluorescência fornece informação sobre o conteúdo de ácidos nucleicos destas partículas. A automação quantifica até 65 mil partículas e permite a diferenciação entre eritrócitos, leucócitos, células epiteliais e bactérias (MANONI, FABIO *et al.*, 2009). O UF-1000i fornece resultados quantitativos em células/ μ L. Para esta análise as amostras foram classificadas em 2 grupos, como descrito a seguir.

- Grupo 1: determinação dos marcadores biológicos presentes na urina, em módulo “usual” de análise no citômetro de fluxo, preconizado pelo fabricante do equipamento. A análise dos elementos dispersos nas amostras deste grupo foi realizada utilizando lavagem simples (padronizadas) da célula de fluxo (*flow cell*) entre as amostras, em módulo sequencial. Nesta configuração, a velocidade de trabalho do UF-1000i é otimizada a cerca de 100 testes/hora.
- Grupo 2: determinação dos marcadores biológicos presentes na urina, com ativação do “módulo anti-carreamento” de bactérias ativado no citômetro de fluxo. Nesta situação o equipamento realiza automaticamente um procedimento de lavagem completa da *flow cell* entre as amostras analisadas toda vez que a contagem de bactérias for maior ou igual a 1000 células/ μ L. Este procedimento, com duração de aproximadamente um minuto e cinquenta segundos, tem como função evitar que células bacterianas permaneçam na câmara de fluxo resultando em contagem de bactérias maior nas amostras subsequentes (*carryover*, arraste). Com este módulo ativado o número de testes/hora é menor que no módulo convencional. Quanto maior o número de amostras com contagem acima de 1000 células/ μ L, menor será o número de

amostras analisadas por hora no citômetro de fluxo. Usualmente é observado uma perda de 20 a 40% na produtividade do equipamento com a ativação do módulo anti-carreamento. O diferencial neste módulo é somente o procedimento de lavagem entre as amostras, os demais passos no citômetro de fluxo são os mesmos do módulo usual.

4.3.3 Análise de carreamento

A análise da taxa de carreamento de bactérias entre amostras consecutivas de urina foi realizada utilizando o diluente empregado no citômetro UF-1000i, tampão TRIS 0,14% (fornecido pelo fabricante do equipamento), como “branco” (referência ou zero). Foram analisadas quatro amostras, com diferentes contagens bacterianas, de urina em módulo automático de leitura e dois tubos consecutivos contendo o diluente, simulando amostras de urina sem bactérias, após cada urina com contagem elevada de bactérias.

4.4 Dados de interesse

Foram capturados do sistema de informação do laboratório os dados referentes a idade e sexo, e os resultados das análises da urina:

I. Marcadores químicos (Urisys 2400)

- Esterase leucocitária (EST)
- Nitrito (NIT)
- Hemoglobina (Hb)
- Proteína (PT)

II. Marcadores celulares (contagens do citômetro de fluxo UF-1000i)

- Eritrócitos
- Leucócitos
- Bactérias

III. Cultura de urina

- Resultado da urocultura (positivo ou negativo)
- Contagem de colônias
- Espécie identificada

Após a captura, os dados foram analisados para remoção de inconsistências e formatados em planilha ativa para análises.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo resultados de pacientes menores de dezoito anos de idade, por serem em número reduzido, principalmente no grupo 2, dificultando a comparação entre os grupos do estudo.

4.6. Análises Estatísticas

A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Komolgorov-Smirnov. As variáveis sem distribuição normal foram reportadas em mediana e intervalo interquartil (25-75%) e foram analisadas pelo teste Mann-Whitney U. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado. A análise estatística foi realizada com o software *Statistica* para *Windows* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). A precisão diagnóstica foi avaliada pela análise em curvas ROC (*receiver operator characteristics*) e o intervalo de referência pelo método preconizado pelo SLSA, ambos calculados com o programa MedCalc (MedCalc software bvba, version 17.2).

O intervalo de referência foi calculado eletronicamente segundo as recomendações do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*), C28-A3, para dados não paramétricos.

Uma probabilidade menor que 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises

5. Resultados e Discussão

Os resultados estão apresentados separadamente para os Grupos 1 e Grupo 2. No grupo 1 as análises no sistema UF1000i (Sysmex) foram realizadas utilizando o módulo normal que realiza a lavagem simples da célula de fluxo entre as amostras, e no grupo 2 foi ativado o módulo anti-carreamento de bactérias.

5.1. Grupo 1

Este grupo compreende um total de 115.319 amostras de urina. As informações relativas ao sexo e idade dos pacientes cujas amostras compõem este grupo estão indicadas na tabela 2. Mulheres adultas (18-46 anos) e mulheres em climatério (≥ 47 anos) (TAVARES et al., 2000; PALACIOS et al., 2010).

Tabela 2. Distribuição da frequência de gêneros nas amostras do Grupo 1

Sexo e idade	Número de amostras	Porcentagem
Mulheres		
18-46 anos	78.962	67,1
≥ 47 anos	22.013	21,8
Total Mulheres	100.975	88,9
Homens		
≥ 18 anos	14.344	11,1
Total geral	115.319	100

Como indicado na tabela, as mulheres representam a maioria (88,9%) da amostra com predomínio (67%) entre 18 a 46 anos.

5.1.1 Cultura de urina

Entre as 115.319 amostras do grupo 1, 83,5% apresentaram uroculturas negativas, resultado compatível com outros estudos similares (DE ROSA *et al.*, 2010; JOLKKONEN *et al.*, 2010).

As culturas de urina nas quais houve desenvolvimento de várias espécies bacterianas em baixa contagem ($<10^3$ UFC/mL) foram consideradas como contaminadas, representaram 6,7% do total amostras.

Culturas positivas foram encontradas em 16,5% das amostras.

A positividade na urocultura para mulheres, 17,6%, foi significativamente maior quando comparada a 8,7% dos homens ($P<0,001$). Portanto, para o local em estudo mulheres apresentam maior incidência de infecção do trato urinário (ITU) o que também foi encontrado por outros autores (DELZELL JR.; LEFEVRE, 2000; FOXMAN, 2010; LEE; NEILD, 2007; SCHMIEMANN *et al.*, 2010).

Diversos patógenos foram recuperados das uroculturas e estão mostrados na Tabela 3. Todos são uropatógenos reconhecidos, e a espécie mais frequentemente isolada foi *Escherichia coli* cuja predominância nas ITU é amplamente conhecida (FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015; PEZZLO, M. 2014; WILSON; GAIDO, 2004).

Tabela 3. Bactérias identificadas e suas frequências em uroculturas positivas na amostra em estudo do grupo 1.

Bactérias	%
<i>E. coli</i>	64,56
<i>S. agalactiae</i>	13,78
<i>K. pneumoniae</i>	4,80
<i>P. mirabilis</i>	4,37
<i>Enterococcus</i> spp	3,67
Grupo KESC	3,20
<i>S. saprophyticus</i>	3,01
<i>Staphylococcus</i> spp	1,48
Grupo PPM	0,52
Outras espécies	0,56

Grupo KESC - *Klebsiella* spp. (excluindo *K. pneumoniae*), *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp.; Grupo PPM - *Proteus* spp. (excluindo *P. mirabilis*), *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Outras espécies - representa 0,56% das bactérias recuperadas e inclui outras espécies de enterobactérias e bacilos gram negativos não fermentadores.

O *S. agalactiae* (*Streptococcus* beta hemolítico do grupo B de Lancefield - GBS) ocupou o segundo lugar em frequência (13,78%) nas uroculturas positivas. Este resultado diverge de outros estudos que observaram uma frequência expressivamente menor (3 a 6%) desta bactéria (BROEREN *et al.*, 2011; DE ROSA *et al.*, 2010; KADKHODA *et al.*, 2011; PIERETTI *et al.*, 2010).

Esta bactéria é frequentemente encontrada colonizando trato genital e gastrointestinal de adultos (BRIMIL *et al.*, 2006), e é um importante agente etiológico causador de infecções oportunistas em idosos, gestantes e recém-nascidos sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal (DUTRA *et al.*, 2014; HEATH; SCHUCHAT, 2007).

O *S. agalactiae* é encontrado como parte da microbiota do trato genital de aproximadamente 25% das mulheres adultas saudáveis, e a colonização de recém natos pela bactéria geralmente ocorre no momento da passagem da criança pelo canal do parto, causando infecções nos primeiros 7 dias de vida (HANSEN *et al.*, 2004). Entre as infecções mais comuns, e com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, estão septicemia e pneumonia, e com menor frequência meningite. Em crianças com mais de 7 dias e durante os 3 primeiros meses de vida, as doenças mais frequentes são septicemia e meningite (PETTERSSON, 2007; ZALEZNIK *et al.*, 2000).

Além da colonização cérvico-vaginal e infecção neonatal que pode resultar da transmissão vertical do *S. agalactiae* das mães aos seus bebês, esta bactéria também é capaz de causar ITU incluindo bacteriúria assintomática, cistite, pielonefrite, uretrite e urosepse. A bacteriúria assintomática é particularmente comum entre as gestantes, e as idosas apresentam maior risco para cistite (TAN *et al.*, 2012).

Recomenda-se que todas as gestantes realizem *screening* para detecção de GBS colonizando os sítios vaginal e anorretal, entre a 35^a e 37^a semana de gestação e nos casos positivos é indicada a quimioprofilaxia para reduzir risco de colonização e desenvolvimento precoce de doenças infecciosas no recém-nato (ADLER *et al.*, 2008; BALTIMORE, 2007; BRIMIL *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2006; “Mae Curitiba MC 2012 completo”, [S.d.]).

Considerando-se o perfil de pacientes atendidos no LMC, composto na sua ampla maioria por pacientes do sexo feminino das quais grande parte é de

gestantes e idosas, inscritas nos programas “Mãe Curitibana” de atenção às gestantes ou de atenção aos idosos, a elevada frequência de GBS requer atenção, uma vez que esse é um agente etiológico causador de infecções oportunistas nestes grupos (DUTRA *et al.*, 2014). Além disso, a elevada frequência de GBS reforça a importância do *screening* para esta bactéria entre as gestantes.

Como indicado na Tabela 2 as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus saprophyticus* estão entre as espécies de uropatógenos mais frequentes identificadas neste trabalho, o que guarda concordância com outros estudos (DE ROSA *et al.*, 2010; KADKHODA *et al.*, 2011).

5.1.2 Exame analítico de urina

Os dados apresentados na sequência incluem os resultados dos exames realizados nos equipamentos Urisys e UF 1000i.

Os resultados das amostras de urina cujas culturas foram consideradas como contaminadas foram excluídos desta análise. Também foram excluídos os resultados de crianças e adolescentes e apenas os resultados de pacientes adultos (≥ 18 anos) foram analisados. Os resultados dos parâmetros selecionados do exame analítico de urina das amostras remanescentes estão indicados na Tabela 4.

O número de registros analisados no presente estudo (tamanho amostral, $n=115.319$), é substancialmente superior a maioria dos estudos publicados associados ao citômetro UF1000i (BROEREN *et al.*, 2011; DE ROSA *et al.*, 2010; GIESEN *et al.*, 2013; KADKHODA *et al.*, 2011; MANONI, F. *et al.*, 2009; PIERETTI *et al.*, 2010).

A Tabela 4 apresenta as características dos registros de urinálise e urocultura utilizados nas análises do Grupo 1.

Tabela 4. Características laboratoriais da amostra do Grupo 1 (módulo usual)

Exame analítico de Urina (n=115.319)	Cultura de Urina			
	Mulheres (n=100.975)		Homens (n=14.344)	
	Negativas (n=83.190) 82,4%	Positivas (n=17.785) 17,6%	Negativas (n=13.103) 91,3%	Positivas (n=1.241) 8,7%
Marcadores Bioquímicos (% positivos) *				
Esterase leucocitária	22,1	50,8	11,3	77,4
Nitrito	1,8	50,7	1,6*	43,5
Hemoglobina	28,8	55,1	25,6	70,8
Proteína	2,8	8,4	8,4	26,6
Contagens do Citômetro de fluxo (células/ μ L)				
Eritrócitos	6,9 (3,6-13,2)	8,4 (4,2-17,9)	4,6 (2,4-9,3)	11,0 (5,0-32,1)
Leucócitos	10,0 (3,9-31,0)	54,0 (17,7-244,3)	3,3 (1,5-9,6)	302,8 (64,3-1.135,0)
Bactérias	290 (103-896)	12.835 (4.799-27.310)	51 (23-118)	971 (3.099-21.983)

Cultura Negativa, contagem de colônias $<10^4$ UFC/mL;

Cultura Positiva, contagem de colônias $\geq 10^4$ UFC/mL

*Critérios para positivo [concentração acima do valor de corte preconizado pelo fabricante do reagente/equipamento]. Na análise química da urina (esterase, nitrito, hemoglobina e proteína), concentrações acima do limite de detecção da tira reagente foram consideradas positivas.

Eritrócitos, Leucócitos e Bactérias-Valores em mediana e intervalo interquartil (25-75%), foram identificadas e quantificadas com citometria de fluxo

Comparações entre Negativo e Positivo para homens e mulheres para os parâmetros em estudo, Probabilidade P, teste *Mann-Whitney* ou teste qui-quadrado, todos **P<0,001**.

*Comparação frequência positiva de nitrito em amostras negativas entre homens e mulheres P=0,272; chi-quadrado).

A Tabela 4 sumariza as características dos ensaios de urinálise e urocultura realizados no Laboratório Municipal de Curitiba, Paraná em tamanho amostral robusto, superior a 100.000 registros.

Como esperado, marcadores bioquímicos e contagem de células foram significativamente (P<0,001) superiores em amostras positivas na urocultura para mulheres e homens.

Entre os marcadores bioquímicos a presença positiva de nitrito, foi o que apresentou maior diferença (cerca de 27 vezes) entre as uroculturas positivas e negativas tanto para mulheres (50,7/1,8 = 28 vezes) como para homens (43,5/1,6 = 27 vezes). A relevância do nitrito positivo para uroculturas com crescimento bacteriano significativo era esperada e está em concordância com a presença de enterobactérias (WINN et al. 2006) dentre as quais destaca-se *E. coli*, isolada em cerca de 65% das uroculturas positivas (Tabela 3).

Nos marcadores bioquímicos, a porcentagem de resultados positivos para esterase leucocitária, nitrito e hemoglobina é cerca de 50 a 55% para mulheres e 43 e 77% para homens. No entanto, culturas negativas também apresentaram positividade para estes marcadores, o que sugere que, isoladamente, não seriam adequados para a triagem das amostras. O mesmo deve ser considerado para a presença de proteínas na urina.

Segundo Little e colaboradores (2006) a detecção de nitrito e esterase leucocitária apresenta sensibilidade de 77% na triagem de culturas de urina. Já no estudo de Semeniuk e Church (1999) foram encontrados valores para sensibilidade variando entre 43,6 a 84,4% quando se considerou a combinação de nitrito com outros marcadores incluindo a esterase leucocitária. Porém, Patel e colaboradores (2005) encontraram sensibilidade de até 98,3% utilizando os marcadores nitrito, esterase leucocitária, hemoglobina e proteína combinados. Com os marcadores nitrito e esterase leucocitária, obtiveram sensibilidade de 90,6% (PATEL *et al.*, 2005).

Relevante ressaltar que a positividade de marcadores bioquímicos na urinálise difere significativamente ($P < 0,001$) entre mulheres e homens. A positividade para esterase 50,8% vs 77,4%, hemoglobina 55,1% vs 70,8% e proteínas 8,4% vs 26,6%, respectivamente para mulheres e homens, mostram que homens apresentam uma positividade maior destes biomarcadores em uroculturas positivas. Portanto, a utilização destes marcadores em um processo de triagem de uroculturas positivas, deve ser analisado atrelado ao gênero, para aumentar o poder discriminante.

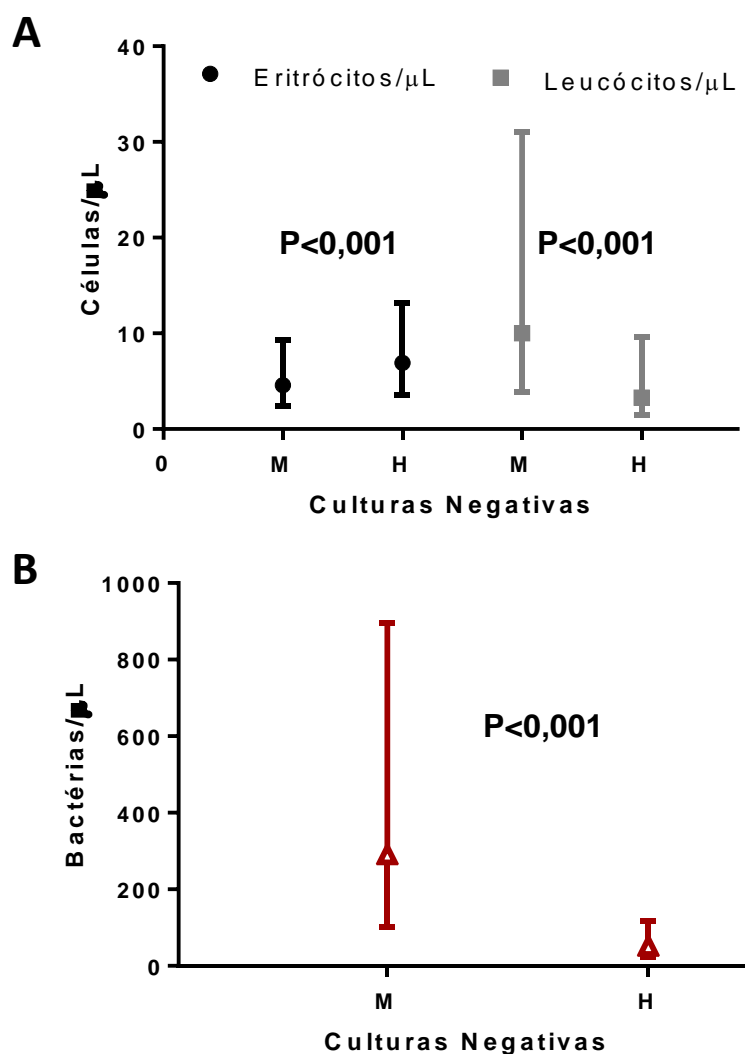
As contagens celulares de leucócitos e bactérias apresentam diferenças significativas na mediana entre amostras de urina com cultura negativa e positiva (Tabela 4) tanto para mulheres como para homens. Estas diferenças expressivas observadas sugerem que estes elementos possam ser discriminadores relevantes como preditores de uroculturas positivas.

A contagem de eritrócitos, embora significativamente maior em uroculturas positivas em ambos os gêneros, não apresentou diferenças marcantes, sugerindo ser um discriminador pobre de uroculturas positivas na amostra em estudo.

Em análise que estratifica mulheres e homens em uroculturas negativas (Figura 1 A e B), fica evidenciado que em contagens celulares em estudo com o

UF1000i (Sysmex), somente os eritrócitos estão presentes em maior concentração nos homens. Mulheres apresentam expressivamente maior concentração ($P < 0,001$) de leucócitos e bactérias. Esta análise é relevante para futuras avaliações do intervalo de referência, sugerindo que este deve ser interpretado por gênero.

Figura 1. Comparações entre gênero dos elementos celulares quantificados por citometria de fluxo no sistema UF1000i no módulo usual em uroculturas negativas.



Os valores estão apresentados em mediana e intervalo interquartil.

M, mulheres e H, homens

Probabilidade, P, teste U de Mann-Whitney.

Figura A. Contagens de Eritrócitos e Leucócitos

Figura B. Contagens de Bactérias.

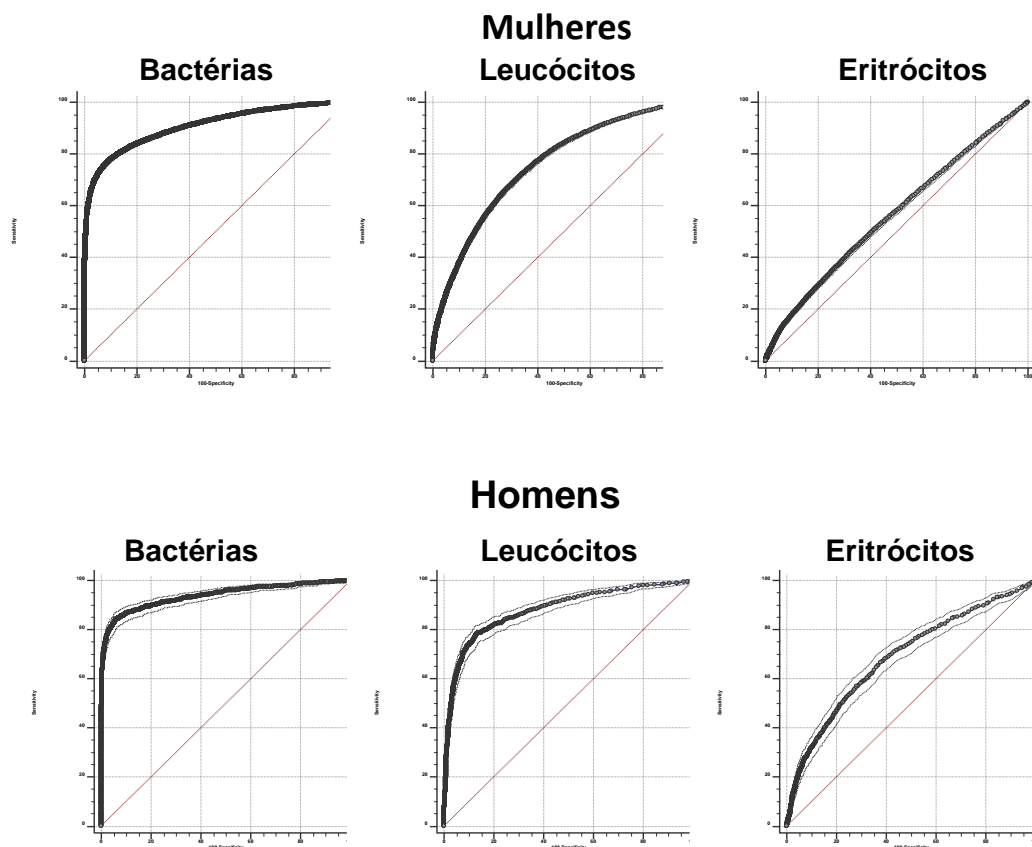
As diferenças observadas estão em sintonia com os valores de referências usualmente empregados no laboratório clínico, que diferenciam mulheres e homens.

5.1.3 Seleção dos valores de corte para contagens celulares analisadas com o UF 1000i

A curva ROC (*receiver operating characteristic* – característica de operação do receptor) tem por finalidade avaliar o desempenho diagnóstico de um teste clínico, contribuindo para a escolha de um ponto de corte capaz de diferenciar o resultado deste teste entre “saudável” (0) e “doente” (1), ou em nosso estudo (0) urocultura negativa e (1) urocultura positiva, sendo o “0” e “1” os códigos utilizados nas análises. Cada contagem na curva terá sensibilidade e especificidade característica e a área sob a curva (AUC) fornece o desempenho do teste. Quanto maior a área sob a curva (máximo = 1,000), melhor o desempenho do teste (AKOBENG, 2007).

A Figura 2 representa a curva ROC gerada comparando as contagens de bactérias, leucócitos e eritrócitos nas amostras com culturas positivas e negativas para homens e mulheres em amostras analisadas em módulo usual na citometria de fluxo.

Figura 2. Curvas ROC para os elementos quantificados por citometria de fluxo no equipamento UF1000i no módulo “usual”.



Receiver Operating Characteristics (ROC) para as contagens de Bactérias, Leucócitos e Eritrócitos, separadas para mulheres e homens adultos.

Amostra	Mulheres		
	Bactérias	Leucócitos	Eritrócitos
Parâmetros			
AUC/P	0,905 / P<0,001	0,758 / P<0,001	0,563 / P<0,001
95%IC	0,90-0,91	0,75-0,76	0,56-0,57
Youden index J	0,679	0,383	0,096
Critério	>2.163	>22	>10
Sensibilidade, %	76,7	67,1	41,5
Especificidade, %	91,2	71,2	68,2
	Homens		
AUC/P	0,937 / P<0,001	0,880 / P<0,001	0,686 / P<0,001
95%IC	0,93-0,94	0,87-0,89	0,68-0,69
Youden index J	0,784	0,651	0,288
Critério	>300	>20	>6
Sensibilidade	84,2	78,2	66,6
Especificidade	94,2	86,9	62,3

AUC, área sobre a curva; 95%IC, intervalo de confiança de 95%

As comparações com a área sob a curva (AUC, *area under the curve*), demonstra que para mulheres e homens as contagens de bactérias e leucócitos são discriminadoras de uroculturas positivas. A contagem de bactérias com AUC superior a 0,90, índice que caracteriza excelente discriminação entre os grupos (uroculturas negativas vs positivas), traduz este parâmetro como o melhor discriminador entre os estudados.

As contagens de eritrócitos são discriminadores pobres, com AUC inferior a 0,70 na amostra em estudo.

No presente estudo o marcador “contagem de bactérias” foi o que apresentou a maior AUC nas curvas ROC e maior sensibilidade e especificidade comparado a contagem de leucócitos. O valor de corte obtido na curva ROC das amostras de mulheres para a contagem de bactérias foi sete vezes superior comparado ao valor de corte para os homens, enquanto que os valores de corte para contagem de leucócitos para homens e mulheres é semelhante, embora a AUC da contagem de leucócitos é maior para homens que para mulheres. Este achado reforça que a utilização destes marcadores deve ser realizada separada por gênero.

Nosso estudo está em concordância com outros trabalhos, que também identificaram associação entre as contagens de bactérias e leucócitos com resultados de culturas de urina negativas e positivas utilizando o critério de urocultura positiva com contagem $\geq 10^4$ UFC/mL. Giesen e colaboradores (2013) encontraram na curva ROC AUC de 0,87 com sensibilidade de 74% e especificidade de 84%, ao passo que no estudo de Broeren et al. (2011), a curva ROC produzida apresentou a AUC de 0,91 para a contagem de bactérias e AUC de 0,76 para a contagem de leucócitos.

Jolkkonen *et al.* (2010) também encontraram valores de corte para contagem de bactérias diferentes para homens (42 células/ μ L) e mulheres (758 células/ μ L), resultados expressivamente diferentes dos apontados em nosso estudo (homens 300 células/ μ L e mulheres 2.163 células/ μ L). As diferenças observadas podem ser devidas ao diferente sistema de contagem celular, características próprias das amostras e principalmente ao tamanho amostral.

Nosso estudo, contempla uma amostra com tamanho amostral expressivamente superior a outros estudos publicados, que tivemos acesso.

5.2 Intervalo de referência

Uma subamostra (n=10.033) foi estabelecida, com características de urocultura negativa (sem desenvolvimento bacteriano) e todos os marcadores bioquímicos analisados (nitrito, esterase, hemoglobina, proteínas) negativos. Os registros clínicos, deste subgrupo não apresentavam indicações de processos patológicos em curso, sugerindo serem exames de rotina.

Esta subamostra foi utilizada para estimar o intervalo de referência das contagens celulares, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Intervalo de referência para contagens celulares em indivíduos com urocultura negativa e ausência de alterações nos marcadores químicos.

Parâmetros	Bactérias (Bactérias/ μ L)	Leucócitos (Leucócitos/ μ L)	Eritrócitos (Eritrócitos/ μ L)
	Mulheres (n=5.748)		
Limite inferior	6	1	1
Mediana	172	5	4
Limite superior	807	24	22
	Homens (n=4.285)		
Limite inferior	2	1	1
Mediana	22	2	3
Limite superior	271	12	14

Teste não paramétrico segundo CLSI C28-A3.

Limite superior e inferior, intervalo de confiança de 90% (IC90%)

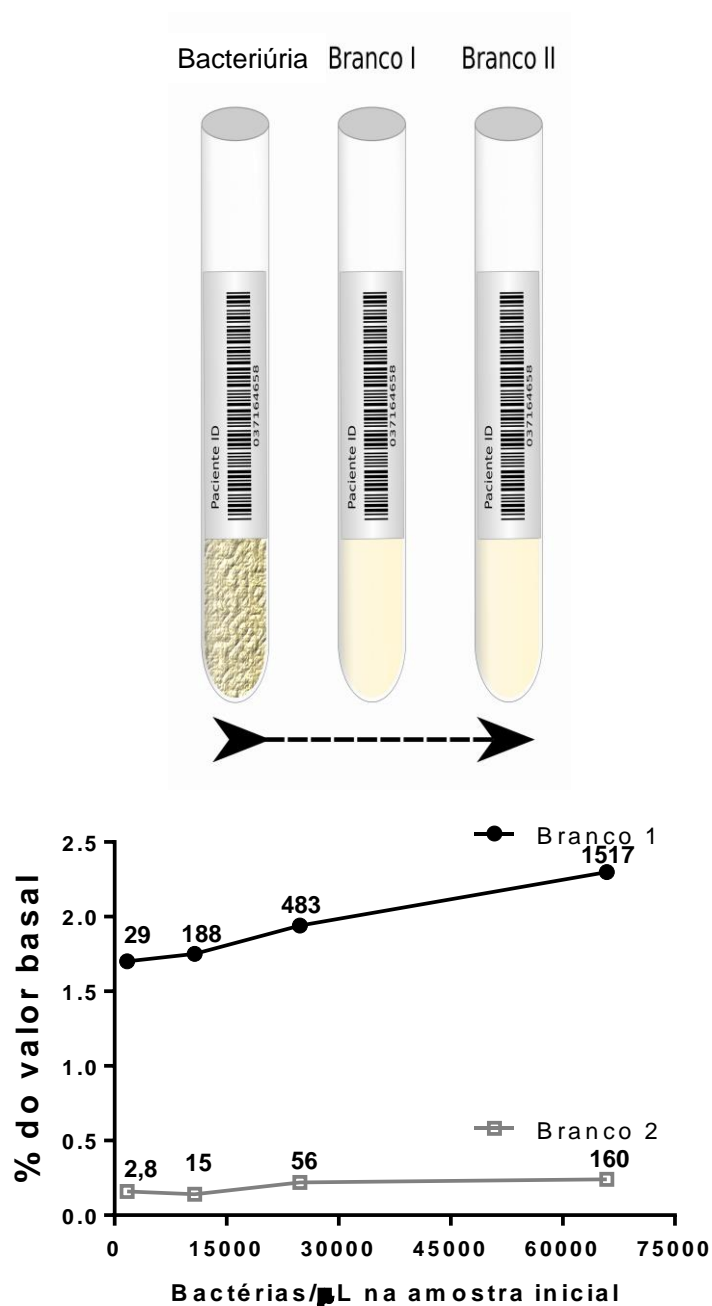
Os limites de referências observados em nossa população são diferentes entre gêneros, como mostrado na Figura 1. Gaspari, D. do Division Manager, Core Laboratory (York Hospital, York, PA) sugere como intervalo de referência, contagens de bactérias ≤ 358 células/ μ L, leucócitos ≤ 28 células/ μ L e eritrócitos ≤ 23 células/ μ L, sem discriminação de gênero (TRIPPIEDI, 2009). Esta proposta diverge do intervalo de referência proposto para nossa população em particular para a contagem de bactérias em mulheres. Propomos que a divergência

observada esteja atrelada aos critérios empregados. Nossos resultados avaliam uma população com características de ausência de processo patológico (intervalo de referência ou valor de referência para uma população sadia) e Gaspari busca critérios de discriminação de doença. Neste contexto, as divergências de valores relatados podem ser explicadas.

5.3 Avaliação do efeito de carreamento de bactérias entre amostras consecutivas no citômetro de fluxo.

A estudo do efeito do carreamento de bactérias entre amostras consecutivas de urina foi realizada utilizando quatro amostras de urina com diferentes contagens de bactérias. Após cada amostra, foi realizado leitura de dois tubos consecutivos contendo o diluente empregado no citômetro UF-1000i, tampão TRIS 0,14%, como “branco” (ou referência, sem bactérias ou partículas). A Figura 3 apresenta os resultados do experimento.

Figura 3. Efeito do carreamento de bactérias entre amostras consecutivas no sistema UF1000i na ausência do módulo anti-carreamento.



A figura superior representa uma amostra de urina com contagem bacteriana elevada sendo seguida por duas amostras que não contemplam bactérias (Branco I e Branco II) mas um tampão Tris que simula uma urina sem bactérias, analisadas em sequência no sistema UF1000i.

A relação porcentual do efeito do carreamento de bactérias é exemplificada na parte inferior da figura.

Quatro amostras com contagens bacterianas de 1.700/μL, 10.759/μL, 24.828/μL e 65.891/μL foram analisadas isoladamente e na sequência de cada uma foram introduzidos dois tubos com solução tampão (Branco I e Branco II) que não contem bactérias ou partículas.

Os números acima dos marcadores indicam a contagem em bactérias/μL registradas no equipamento UF1000i. Os resultados são expressos em porcentagem da contagem inicial para cada ensaio.

Quatro amostras de urina com concentrações 1.700/ μL a 65.000/ μL bactérias promovem carreamento de 29 a 1.500 bactérias/ μL para a amostra subsequente (1,7 a 2,4% da contagem da amostra inicial) como mostrado na Figura 3.

Extrapolando os resultados da Figura 3, é previsível que na presença de uma amostra com contagem de bactérias de 20.000/ μL , a amostra subsequente receba por arraste cerca de 200 bactérias/ μL , o que promoveria um resultado alterado para um homem (referencia <271/ μL , Tabela 4) que na forma natural não apresentasse este elemento na urina. A mesma lógica se aplica para mulheres onde uma amostra com mais de 35.000 bactérias/ μL tem potencial para alterar significativamente a interpretação dos resultados, promovendo uma elevação falsa de cerca de 800 bactérias/ μL (referencia <807/ μL , Tabela 4). Outro elemento a ser considerado, é o efeito aditivo. As bactérias transferidas pelo carreamento para a outra amostra subsequente, são somadas aquelas já existentes promovendo um resultado falso positivo (ou ampliando falsamente o número de bactérias/ μL).

O segundo tubo, designado de Branco II, mostra que o efeito do carreamento reduz em cerca de 10 vezes, o arraste de bactérias, nesta condição. Este segundo tubo, seria afetado de forma a alterar seu resultado significativamente somente em condições excepcionais, onde a contagem de bactérias no tubo inicial superasse 150.000/ μL , o que é incomum. O resultado sugere que uma lavagem após uma amostra com elevada contagem celular pode ser suficiente para reduzir o arraste de bactérias a níveis negligíveis.

A utilização da contagem de bactérias como marcador de uroculturas positivas, portanto, é afetada pelo processo de carreamento de bactérias entre uma amostra com contagem alta e a amostra subsequente. Propomos, portanto, que a eliminação deste efeito do carreamento ou sua minimização sejam empregados caso a contagem de bactérias seja utilizada para triar uroculturas positivas, minimizando os resultados falso positivos.

5.3.1. Análises do Grupo 2 (módulo anti-carreamento ativado)

A análise dos elementos dispersos nas amostras do grupo 1 foi realizada utilizando lavagem simples da *flow cell* entre as amostras, em módulo sequencial. Esta é a configuração padrão recomendada pelo fabricante do equipamento UF1000i. Nesta configuração, a velocidade de trabalho do UF 1000i é de até 100 testes hora.

No Grupo 2 as análises foram realizadas com o módulo anti-carreamento de bactérias ativado. Nesta situação o equipamento realiza automaticamente um procedimento de lavagem completo da célula de fluxo (*flow cell*) entre as amostras analisadas toda vez que a contagem de bactérias for ≥ 1.000 células/ μL .

Novos registros de resultados da urinálise (n=13.572), foram obtidos no Laboratório Municipal de Curitiba, para este estudo.

A tabela 6 apresenta estatística descritiva das variáveis observadas no exame analítico com o módulo anti-carreamento ativado.

Os resultados obtidos para o Grupo 2 são semelhantes aos descritos para o Grupo 1 (Tabela 4) para as contagens celulares em estudo.

Tabela 6. Características laboratoriais da amostra com o módulo anti-carreamento

Citometria (n=13.572)	Cultura de Urina			
	Mulheres (n=11.816)		Homens (n=1.756)	
	Negativas (n=9.877) 83,6%	Positivas (n=1.939) 16,4%	Negativas (n=1.615) 91,9%	Positivas (n=141) 8,1%
Contagens do Citômetro de fluxo (células/ μ L)				
Eritrócitos	7,3 (3,9-13,1)	8,6 (4,5-17,9)	4,6 (2,4-9,0)	11,0 (5,0-47,1)
Leucócitos	9,3 (4,0-26,7)	50,4 (16,4-219,6)	3,3 (1,7-9,0)	192,0 (53,1-971,2)
Bactérias	252 (81-788)	13.422 (5.153-27.026)	30,5 (11-85)	13.141 (5.237-25.485)

Cultura Negativa, contagem de colônias $<10^4$ UFC/mL;

Cultura Positiva, contagem de colônias $\geq 10^4$ UFC/mL

*Critérios para positivo [concentração acima do valor de corte preconizado pelo fabricante do reagente/equipamento]. Na análise química da urina (esterase, nitrito, hemoglobina e proteína), concentrações acima do limite de detecção da tira reagente foram consideradas positivas.

Eritrócitos, Leucócitos e Bactérias-Valores em mediana e intervalo interquartil (25-75%), foram identificadas e quantificadas com citometria de fluxo

Comparações entre Negativo e Positivo para homens e mulheres para os parâmetros em estudo, Probabilidade P, teste *Mann-Whitney* ou teste qui-quadrado, todos **P<0,001**.

A tabela 7 apresenta os principais achados na cultura de urina no grupo 2 analisadas em módulo anti-carreamento de bactérias ativado no citômetro de fluxo.

Os dados obtidos no grupo 2 são similares aos encontrados em estudos semelhantes descritos anteriormente (DE ROSA *et al.*, 2010; JOLKKONEN *et al.*, 2010; KADKHODA *et al.*, 2011).

Tabela 7. Frequências das bactérias identificadas nos registros obtidos com ativação do módulo anti-carreamento de bactérias no citômetro de fluxo para o Grupo 2.

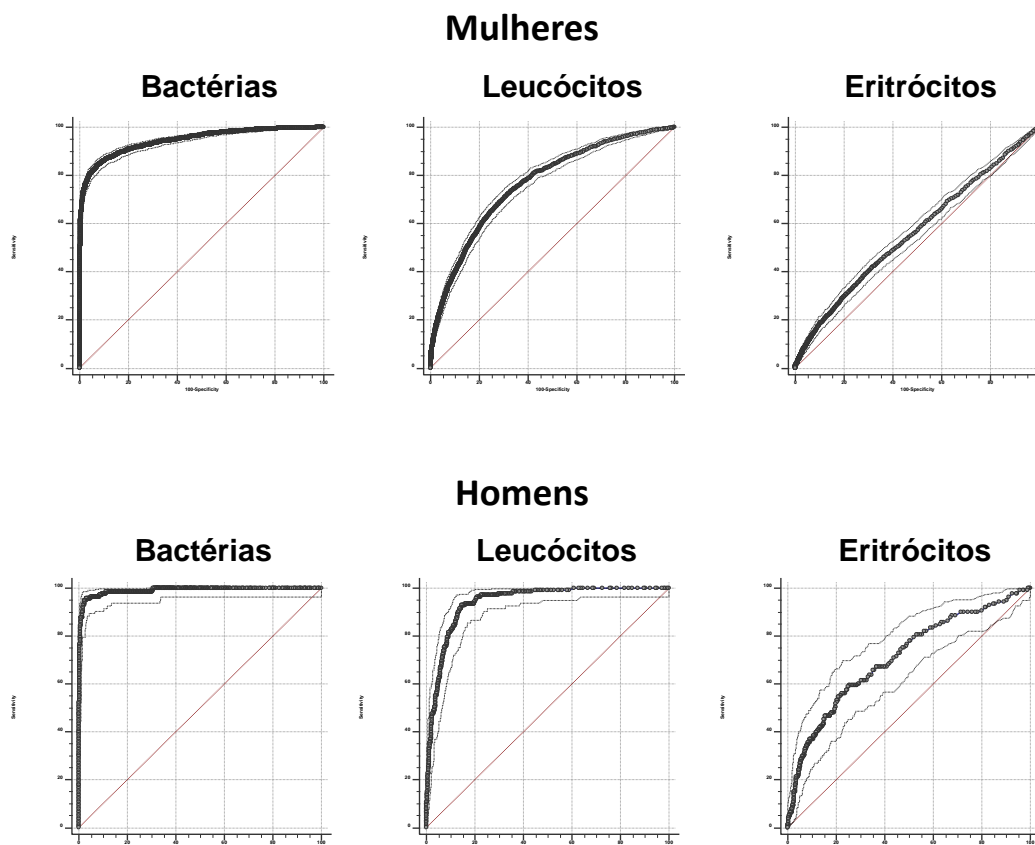
Achados na Urocultura	%
<i>Escherichia coli</i>	70,15
<i>Streptococcus agalactiae</i>	9,65
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,18
<i>Proteus mirabilis</i>	4,16
Grupo KESC	3,63
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,75
<i>Enterococcus</i> spp	2,26
<i>Staphylococcus</i> spp	1,33
Grupo PPM	0,35
Outras espécies	0,53

Grupo KESC - *Klebsiella* spp. (excluindo *K. pneumoniae*), *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp.; Grupo PPM - *Proteus* spp. (excluindo *P. mirabilis*), *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Outras espécies - representa 0,53% das bactérias recuperadas e inclui outras espécies de enterobactérias e bacilos gram negativos não fermentadores.

5.3.2. Análise da discriminação de uroculturas positivas com contagens de células identificadas por citometria de fluxo no sistema UF 1000i com sistema anti-carreamento ativo

A Figura 4 representa a curva ROC gerada comparando as contagens de bactérias, leucócitos e eritrócitos nas amostras com culturas positivas e negativas para homens e mulheres em amostras analisadas no módulo anti-carreamento de bactérias ativado na citometria de fluxo.

Figura 4. Curvas ROC para os elementos quantificados por citometria de fluxo no equipamento UF1000i com ativação do módulo anti-carreamento.



Receiver Operating Characteristics (ROC) para as contagens de Bactérias, Leucócitos e Eritrócitos, separadas para mulheres e homens adultos com módulo anti-carreamento.

Amostra	Mulheres		
Parâmetros	Bactérias	Leucócitos	Eritrócitos
AUC/P	0,945 / P<0,001	0,765 / P<0,001	0,561 / P<0,001
95%IC	0,94-0,95	0,76-0,77	0,55-0,57
Youden index J	0,768	0,405	0,102
Critério	>2.448	>19	>11
Sensibilidade, %	84,0	72,3	41,4
Especificidade, %	92,8	68,2	68,8
	Homens		
AUC/P	0,989 / P<0,001	0,940 / P<0,001	0,709 / P<0,001
95%IC	0,987-0,99	0,93-0,95	0,69-0,73
Youden index J	0,926	0,782	0,341
Critério	>359	>19	>9
Sensibilidade	95,7	92,9	59,6
Especificidade	96,8	95,3	74,6

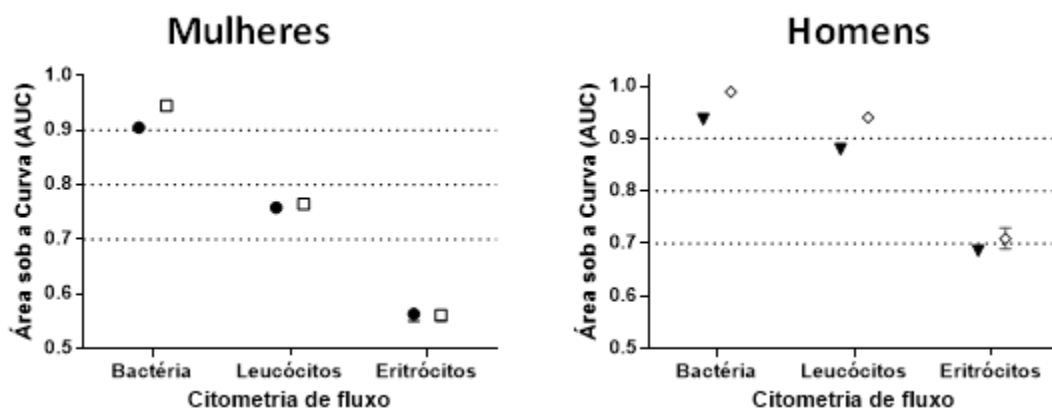
AUC, área sobre a curva; 95%IC, intervalo de confiança de 95%

O perfil observado na Figura 4 para as áreas sob a curva (AUC) é semelhante ao apresentado para o Grupo 1 (Figura 2). Novamente o melhor discriminador de uroculturas positivas está centrado na contagem de bactérias (AUC >0,90) para mulheres e homens, seguido da contagem de leucócitos. A contagem de eritrócitos foi pouco discriminante (AUC <0,70).

Uma diferença relevante observada está na contagem de leucócitos para homens. Na condição de ativação do processo anti-carreamento, a discriminação com a contagem leucócitos em homens é semelhante à observada para bactérias (Figura 4) e melhor discriminante da observada nos resultados sem o módulo anti-carreamento, grupo 1 (Figura 2). Nossa hipótese para este efeito repousa no fato que a contagem de bactérias e leucócitos para homens ser expressivamente menor quando comparado à mulheres (Tabela 5). Neste contexto, um carreamento de bactérias tem potencial de afetar com maior intensidade as contagens em homens e promover maior número de resultados falso positivos, quando comparado a mulheres. Quando este efeito é eliminado pela lavagem anti-carreamento, a contagem de leucócitos ressurgem com um bom discriminante neste gênero.

As comparações entre os marcadores de uroculturas positivas para os grupos 1 e 2 estão apresentados na Figura 5, que apresenta comparação entre as AUCs obtidas para contagens de células no módulo “usual” e módulo “anti-carreamento” de bactérias para mulheres e homens.

Figura 5. Comparações entre as áreas sob a curva ROC para mulheres e homens adultos quanto às células quantificadas por Citometria de fluxo (UF1000i) no módulo usual (Grupo 1) e com ativação do módulo anti-carreamento (Grupo 2).



Os dados são área sob a curva (AUC) e as barras verticais 95%IC descritos nas Figuras 2 e 4. Os símbolos fechados (círculo e triângulo) representam resultados do Módulo Usual e os símbolos abertos (quadrado e losango) o Módulo anti-carreamento. As linhas tracejadas horizontais na AUC entre 1,0-0,9; 0,9-0,8 e 0,8-0,7 indicam discriminação excelente, boa e regular, respectivamente.

A contagem de bactérias para homens e mulheres apresentou a maior AUC entre os parâmetros analisados, $\geq 0,90$, considerado excelente discriminador, na presença ou ausência do módulo anti-carreamento.

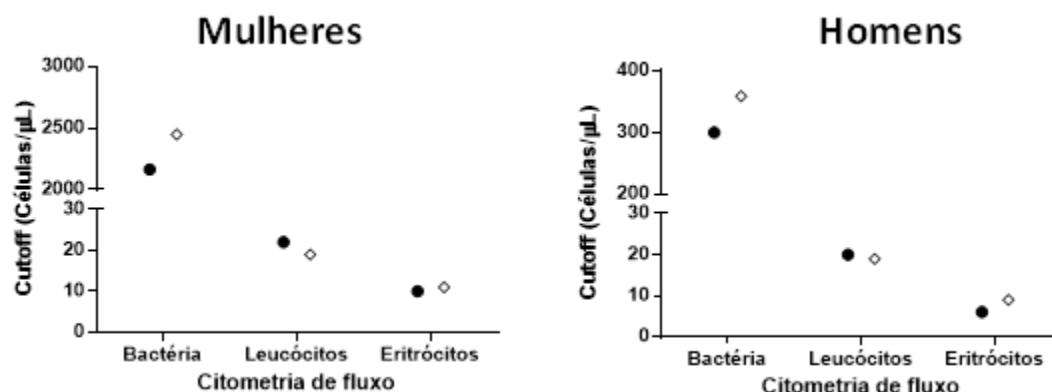
A ativação do módulo anti-carreamento aumentou a AUC (poder discriminante) para as contagens de bactérias e leucócitos, sendo para este último marcador diferença expressiva nos homens (Figura 5, homens).

As contagens de eritrócitos, foram discriminantes com pior desempenho entre os analisados em quaisquer condições.

A análise comparativa sugere que a ativação do módulo anti-carreamento tem potencial para melhorar a capacidade discriminante das contagens de bactérias e leucócitos para identificar uroculturas positivas.

As comparações entre os valores de corte para as contagens celulares em estudo estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Comparações entre os valores de corte (*cutoff*) para mulheres e homens adultos em relação às células quantificadas por Citometria de fluxo (UF1000i).



Os dados contagens de células/ μL identificadas como critério de corte (*cutoff*) com as curvas ROC descritos nas Figuras 2 e 4. Os símbolos fechados (círculos) representam resultados do Módulo Usual e os símbolos abertos (losango) o Módulo anti-carreamento.

A Figura 6 apresenta comparação dos valores de corte obtidos para as contagens celulares da citometria de fluxo, para mulheres e homens nas amostras analisadas no módulo usual e anti-carreamento de bactérias.

A utilização do módulo anti-carreamento altera o valor de corte para discriminação de uroculturas positivas, quando comparado ao módulo usual para contagem de bactérias para homens e mulheres (Figura 6). O resultado era esperado, pois na presença da ativação do módulo anti-carreamento, é previsto uma redução dos resultados falso-positivos, o que melhora a predição pela curva ROC.

Para as contagens de leucócitos e eritrócitos, as diferenças observadas são pequenas e possivelmente pouco significativas.

6. Conclusões

- Duas estirpes bacterianas foram predominantes e identificadas em cerca de 78% das uroculturas positivas, a *Escherichia coli* (64%) e o *Streptococcus agalactiae* (14%) na amostra em estudo;
- As contagens de bactérias e leucócitos, analisados pela curva ROC, têm capacidade de discriminar uroculturas positivas, e a contagem de eritrócitos é um discriminador pobre.
- A contagem de bactérias foi o melhor discriminador de uroculturas positivas, para mulheres e homens, com AUC >0,90 e sensibilidade >75% e especificidade >90% em todas as condições testadas.
- O carregamento de bactérias entre amostras com elevada contagem bacteriana tem potencial de magnificar (falso positivo) o resultado da amostra sequencial.
- A ativação do módulo anti-carreamento melhora a discriminação de uroculturas positivas com a contagem bacteriana, sendo recomendado sua aplicação.
- Valores de corte para contagens de bactérias e leucócitos para discriminar amostras com uroculturas positivas devem considerar o gênero e ativação do módulo anti-carreamento.
- Uma estimativa do intervalo de referência para contagens celulares, utilizando o sistema automatizado UF 1000i (Sysmex) apresentou valores máximos, com intervalo de confiança de 90%, para mulheres, de bactérias <807/ μ L, leucócitos <24/ μ L e eritrócitos <22/ μ L; e para homens, bactérias <271/ μ L, leucócitos <12/ μ L e eritrócitos <14/ μ L.
- As contagens de bactérias na urina por citometria de fluxo têm potencial para oferecer informações consistentes sobre a probabilidade de uroculturas positivas.

7. Perspectivas Futuras

Analisando as contagens celulares com o módulo anti-carreamento, propomos informar no laudo da urinálise, uma recomendação aos clínicos quando à possibilidade de uma urocultura positiva.

Amostras de pacientes com bacteriúria acima dos valores de corte identificados neste estudo, devidamente separados podem oferecer informações antecipadas da urocultura positiva. Como o ensaio de urinálise tem liberação em prazo inferior a 12 horas, contrastando com a cultura de urina que pode superar as 48 horas para a liberação do resultado, o paciente poderia receber atenção diferenciada quando a predição de positividade da urocultura for elevada. Este elemento tem potencial relevante para a atenção do paciente, tratamento precoce e reduzir o grau de lesão. Uma ação rápida sobre o paciente promove a maior aderência deste ao tratamento, com benefícios reconhecidos.

Propomos para estudos futuros, analisar com plataformas de bioinformática os dados antropométricos, marcadores da bioquímica (química) e das contagens celulares (objeto primário deste estudo). Nossa expectativa é desenvolver um sistema automatizado de informação ao paciente, ao clínico e ao sistema de saúde da probabilidade de um paciente apresentar infecção urinária, com elevadas sensibilidade e especificidades

Propomos que esta ação, tem potencial para melhorar a eficácia ao tratamento da infecção urinária e aderência do paciente.

8. Referências

ADLER, A. *et al.* Culture-based methods for detection and identification of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women - What are we missing? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** v. 27, n. 3, p. 241–243 , 2008.

AKOBENG, A. K. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. **Acta paediatrica** v. 96, n. 5, p. 644–647 , 2007.08035253.

ASPEVALL, O. *et al.* European guidelines for urinalysis: A collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. **Clinical Microbiology and Infection** v. 7, n. 4, p. 173–178 , 2001.1198743X.

BALTIMORE, R. S. Consequences of Prophylaxis for Group B Streptococcal Infections of the Neonate. **Seminars in Perinatology** v. 31, n. 1, p. 33–38 , 2007.0146-0005 (Print)r0146-0005 (Linking).

BENT, S.; SIMEL, D. L; FIHN, S. D. Does This Woman Have an Acute Uncomplicated Urinary Tract Infection? **JAMA: the journal of the American Medical Association** v. 287, n. 20, p. 2701–2710 , 2013.

BRIMIL, N. *et al.* Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. **International Journal of Medical Microbiology** v. 296, n. 1, p. 39–44 , 2006.1438-4221.

BROEREN, M. a C *et al.* Screening for urinary tract infection with the sysmex UF-1000i urine flow cytometer. **Journal of Clinical Microbiology** v. 49, n. 3, p. 1025–1029 , 2011.

BURD, E. M.; KEHL, K. S. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Urinary Tract Infections. **Journal of Clinical Microbiology** v. 49, n. 404, p. S34–S38 , 2011.

CHENG, P. J. *et al.* Maternal anxiety about prenatal screening for group B streptococcus disease and impact of positive colonization results. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology** v. 128, n. 1–2, p. 29–33 , 2006.

CHIEN, T. I. *et al.* Urine sediment examination: A comparison of automated urinalysis systems and manual microscopy. **Clinica Chimica Acta** v. 384, n. 1–2, p. 28–34 , 2007.

CHUNG, A.; ARIANAYAGAM, M.; RASHID, P. Bacterial cystitis in women. **Australian Family Physician** v. 39, n. 5, p. 295–298 , 2010.0300-8495 (Print)r0300-8495 (Linking).

DARLING, C. L. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. **Journal of Clinical Microbiology** v. 1, n. 2, p. 171–174 , 1975.

DE ROSA, R. *et al.* Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. **Clinica Chimica Acta** De rosa et al, trabalharam com amostras de 1349 pacientes, de 0 a 98 anos de ambos os sexos, v. 411, n. 15–16, p. 1137–1142 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.03.027>>.

DELZELL JR., J E; LEFEVRE, M L. Urinary tract infections during pregnancy. **American Family Physician** v. 61, n. 3, p. 713–720 , 2000.0002-838X.

DEMILIE, T. *et al.* Diagnostic accuracy of rapid urine dipstick test to predict urinary tract infection among pregnant women in Felege Hiwot Referral Hospital, Bahir Dar, North West Ethiopia. **BMC research notes** v. 7, n. 1, p. 481 , 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/481>>.

DERESE, B. *et al.* Bacterial profile of urinary tract infection and antimicrobial susceptibility pattern among pregnant women attending at Antenatal Clinic in Dil Chora Referral Hospital , Dire Dawa , Eastern Ethiopia. **Therapeutics and risk management** v. 12, p. 251–260 , 2016.

DEVILLÉ, W. L. J. M. *et al.* The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. **BMC urology** v. 4, p. 4 , 2004. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/pmc/articles/PMC434513/?report=abstract>>.1471-2490.

DUTRA, V. G. *et al.* Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC infectious diseases** v. 14, p. 323 , 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4061772&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.1471-2334 (Electronic)r1471-2334 (Linking).

FAHEY, T *et al.* Clinical management of urinary tract infection in women: a prospective cohort study. **Family Practice** v. 20, n. 1, p. 1–6 , 2003.0263-2136.

FENWICK, E A; BRIGGS, A H; HAWKE, C I. Management of urinary tract infection in general practice: a cost-effectiveness analysis. **The British journal of general practice: the journal of the Royal College of General Practitioners** v. 50, n. 457, p. 635–9 , 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1313774&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.0960-1643 (Print)r0960-1643 (Linking).

FLORES-MEIRELES, A. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews Microbiology** v. 13, n. 5, p. 269–284 , 2015.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. **Disease-a-Month** v. 49, n. 2, p. 53–70 , 2003.0002-9343 (Print)r0002-9343 (Linking).

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol** v. 7, n. 12, p. 653–660 , 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139641>>.1759-4812.

FOXMAN, B. *et al.* Urinary tract infection: Self-reported incidence and associated costs. **Annals of Epidemiology** v. 10, n. 8, p. 509–515 , 2000.1047-2797 (Print)r1047-2797.

GIESEN, C. D. *et al.* Performance of flow cytometry to screen urine for bacteria and white blood cells prior to urine culture. **Clinical Biochemistry** v. 46, n. 9, p. 810–813 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.005>>.0009-9120.

GLASER, A. P.; SCHAEFFER, A. J. Urinary Tract Infection and Bacteriuria in Pregnancy. **Urologic Clinics of North America** v. 42, n. 4, p. 547–560 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2015.05.004>>.0094-0143.

HANSEN, S. M. *et al.* Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 1, p. 83–89 , 2004.0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking).

HEATH, P. T; SCHUCHAT, A. Perinatal group B streptococcal disease. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology** v. 21, n. 3, p. 411–424 , 2007.1521-6934 (Print).

IVANČIĆ, V. *et al.* Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. **Journal of Clinical Microbiology** v. 46, n. 4, p. 1213–1219 , 2008.

JOLKKONEN, S. *et al.* Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. **Journal of Clinical Microbiology** v. 48, n. 9, p. 3117–3121 , 2010.

KADKHODA, K. *et al.* UF-1000i flow cytometry is an effective screening method for urine specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 69, n. 2, p. 130–136 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.013>>.1204237212.

KELLOGG, J a *et al.* Clinical relevance of culture versus screens for the detection of microbial pathogens in urine specimens. **The American journal of medicine** v. 83, n. 4, p. 739–745 , 1987.

KOEIJERS, J. J. *et al.* Urinary tract infection in male general practice patients: Uropathogens and antibiotic susceptibility. **Urology** v. 76, n. 2, p. 336–340 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.02.052>>.

KOKEN, T. *et al.* Determination of cut-off values for leucocytes and bacteria for urine flow cytometer (UF-100) in urinary tract infections. **International Urology and Nephrology** v. 34, n. 2, p. 175–178 , 2002.

KUBIK, M. J.; MCCARTER, Y. S. Controversies in the diagnosis of urinary tract infections. **Clinical Microbiology Newsletter** v. 34, n. 23, p. 185–191 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2012.11.001>>.9042446684.

LANGLOIS, M. R. *et al.* Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. **Clinical Chemistry** v. 45, n. 1, p. 118–122 , 1999.

LE, Z. *et al.* Performance of the Sysmex UF-1000i urine analyser in the rapid diagnosis of urinary tract infections in hospitalized patients. **Journal of Infection and Chemotherapy** , 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X16300010>>.

LEE, J. B.L.; NEILD, G. H. Urinary tract infection. **Medicine**. [S.l: s.n.], 2007. 35 v. p. 423–428. Disponível em: <<http://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357303907001466/fulltext>>.

LINHARES, I. *et al.* Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). **BMC infectious diseases** v. 13, p. 19 , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327474>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3556060>.1471-2334 (Electronic)r1471-2334 (Linking).

LIPSKY, B. A. Prostatitis and urinary tract infection in men: What's new; what's true? **American Journal of Medicine** v. 106, n. 3, p. 327–334 , 1999.0002-9343 (Print)r0002-9343 (Linking).

LITTLE, P. *et al.* Developing clinical rules to predict urinary tract infection in primary care settings: Sensitivity and specificity of near patient tests (dipsticks) and clinical scores. **British Journal of General Practice** v. 56, n. 529, p. 606–612 , 2006.0960-1643.

Mae Curitiba MC 2012 completo. . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

MANONI, F *et al.* Measurement of urine leukocytes by a second generation flow cytometer; application in the diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. v. 2, n. 7, p. 19–27 , 2010. Disponível em: <<http://www.simel.it/it/riviste/articolopdf.php/840>>.

MANONI, F. *et al.* Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 65, n. 2, p. 103–107 , 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.003>>.

MARSCHAL, M. *et al.* Evaluation of 3 different rapid automated systems for diagnosis of urinary tract infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 72, n. 2, p. 125–130 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.10.001>>.

MATUSZKIEWICZ-ROWIŃSKA, J.; MAŁYSZKO, J.; WIELICZKO, M. Urinary tract infections in pregnancy: old and new unresolved diagnostic and therapeutic problems. **Archives of medical science: AMS** v. 11, n. 1, p. 67–77 , 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4379362&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

MONSEN, T.; RYDÉN, P. Flow cytometry analysis using sysmex UF-1000i classifies uropathogens based on bacterial, leukocyte, and erythrocyte counts in urine specimens among patients with urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology** v. 53, n. 2, p. 539–545 , 2015.

MOSHAVER, B. *et al.* Fast and accurate prediction of positive and negative urine cultures by flow cytometry. **BMC infectious diseases** v. 16, n. 1, p. 211 , 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4869392&tool=pmc>>.

entrez&rendertype=abstract>.1287901615574.

NICOLLE, L E. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. **The Journal of infectious diseases** v. 183 Suppl, p. S5-8 , 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171003>>.0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking).

OKADA, H. *et al.* Detection of significant bacteriuria by automated urinalysis using flow cytometry. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 8, p. 2870–2872 , 2000.

OKADA, H. *et al.* Enumeration of bacterial cell numbers and detection of significant bacteriuria by use of a new flow cytometry-based device. **Journal of Clinical Microbiology** v. 44, n. 10, p. 3596–3599 , 2006.

OLADEINDE, B. H; OMOREGIE, R.; OLADEINDE, O. B. Asymptomatic Urinary Tract Infection among Pregnant Women Receiving Ante-Natal Care in a Traditional Birth Home in Benin City, Nigeria. **Ethiop J Health Sci** v. Vol 15, No, n. 1, p. 3–8 , 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4337079&tool=pmc> entrez&rendertype=abstract>.

OTTIGER, C.; SCHAER, G.; HUBER, A. R. Time-course of quantitative urinary leukocytes and bacteria counts during antibiotic therapy in women with symptoms of urinary tract infection. **Clinica Chimica Acta** v. 379, n. 1–2, p. 36–41 , 2007.0009-8981.

PATEL, H D *et al.* Can urine dipstick testing for urinary tract infection at point of care reduce laboratory workload? **Journal of clinical pathology** v. 58, n. 9, p. 951–954 , 2005.0021-9746.

PAYNE, M; ROSCOE, D. Evaluation of two chromogenic media for the isolation and identification of urinary tract pathogens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 34, n. 2, p. 303–308 , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25172638>>.1435-4373 (Electronic)0934-9723 (Linking).

PERRY, J. D. *et al.* Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. **Letters in Applied Microbiology** v. 43, n. 6, p. 615–618 , 2006.0266-8254 (Print)r0266-8254 (Linking).

PETTERSSON, K. Perinatal infection with Group B streptococci. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** v. 12, n. 3, p. 193–197 , 2007.1744-165X (Print).

PEZZLO, M. T. *et al.* Detection of bacteriuria and pyuria by URISCREEN, a rapid enzymatic screening test. **Journal of Clinical Microbiology** v. 30, n. 3, p. 680–684 , 1992.

PEZZLO, M. Laboratory diagnosis of urinary tract infections: Guidelines, challenges, and innovations. **Clinical Microbiology Newsletter** v. 36, n. 12, p. 87–93 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.05.003>>.0196-4399.

PFALLER, M. A.; KOONTZ, F. P. Laboratory evaluation of leukocyte esterase and nitrite tests for the detection of bacteriuria. **Journal of Clinical Microbiology**

v. 21, n. 5, p. 840–842 , 1985.

PIERETTI, B. *et al.* Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. **Journal of Clinical Microbiology** v. 48, n. 11, p. 3990–3996 , 2010.1098-660X (Electronic)r0095-1137 (Linking).

RAJARATNAM, A. *et al.* Diagnosis of asymptomatic bacteriuria and associated risk factors among pregnant women in Mangalore, Karnataka state. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 8, n. 9, p. OC23-OC25 , 2014.

SCHMIEMANN, G. *et al.* The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. **Deutsches Ärzteblatt international** v. 107, n. 21, p. 361–7 , 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539810>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2883276>>.1866-0452 (Electronic) 1866-0452 (Linking).

SEMENIUK, H.; CHURCH, D. Evaluation of the leukocyte esterase and nitrite urine dipstick screening tests for detection of bacteriuria in women with suspected uncomplicated urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology** v. 37, n. 9, p. 3051–3052 , 1999.

SHIEN, T; ALONTO, A. **A Review of Uncomplicated Urinary Tract Infections.** [S.l: s.n.], 2011. 6-7 p. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/urinary-tract-infections/a-review-of-uncomplicated-urinary-tract-infections>>. .

SHINE, Y. K. *et al.* Evaluation of the Sysmex UF-100 urine cell analyzer as a screening test to reduce the need for urine cultures for community-acquired urinary tract infection. **American Journal of Clinical Pathology** v. 128, n. 6, p. 922–925 , 2007.

ST JOHN, A. *et al.* The use of urinary dipstick tests to exclude urinary tract infection: a systematic review of the literature. **American journal of clinical pathology** v. 126, n. 3, p. 428–436 , 2006.

TAN, C. K. *et al.* Genome-wide mapping of cystitis due to *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in mice identifies a unique bladder transcriptome that signifies pathogen-specific antimicrobial defense against urinary tract infection. **Infection and Immunity** v. 80, n. 9, p. 3145–3160 , 2012.6175678079.

TRIPPIEDI, C. Automation offers urinalysis upgrades. **Medical Laboratory Observer**. v.41, n.11, p.

WILSON, M. L.; GAIDO, L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America** v. 39, n. 6, p. 873; author reply 873-874 , 2004.

WINN, W.C Jr; *et al.* Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6ª edição. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

ZALEZNIK, D. F. *et al.* Invasive Disease Due to Group B *Streptococcus* in Pregnant Women and Neonates from Diverse Population Groups. **Clinical Infectious Diseases** v. 30, n. 2, p. 276–281 , 2000. Disponível em:

<<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/313665>>.1058-4838.

ZAMAN, Z.; ROGGEMAN, S.; VERHAEGEN, J. Unsatisfactory performance of flow cytometer UF-100 and urine strips in predicting outcome of urine cultures. **Journal of Clinical Microbiology** v. 39, n. 11, p. 4169–4171 , 2001.