

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: GASTROENTEROLOGIA

**AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO DA
ASCITE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM HIPERTENSÃO PORTA**

SANDRA MARIA GONÇALVES VIEIRA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:GASTROENTEROLOGIA

**AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO DA
ASCITE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM HIPERTENSÃO PORTA**

SANDRA MARIA GONÇALVES VIEIRA

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

VIEIRA, Sandra Maria Gonçalves

Amplificação do DNA bacteriano no diagnóstico da infecção da ascite em crianças e adolescentes com hipertensão porta ; orient. Themis Reverbel da Silveira. – 2003.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia.

1. DNA bacteriano: Infecção da ascite 2. Hipertensão Porta 3. Criança 4. Adolescência I. Silveira, Themis Reverbel da.

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIA

“O homem (...) é por assim dizer um animal que, tendo esfregado os olhos, olha espantado à sua volta porque se apercebe do outro, porque tem diante de si um mundo que lhe foi dado como dádiva inexplicável. É esta descoberta da existência do mundo que permite a entrada em cena daquilo que é propriamente humano: língua, cultura, arte, ciência, religião, alegria e amor.”

F Buytendijk, biólogo

Essa tese é dedicada:

Aos meus pais, por estarem sempre presentes.

Aos meus colegas e amigos da Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por caminhararmos juntos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“O que é solidariedade? (...) é um estado de alma (...). Ser solidário é pertencer a um mesmo conjunto (...) e partilhar uma mesma história.”

André Comte-Sponville

À Dra. **Ursula da Silveira Matte**, por todo o empenho pessoal demonstrado na realização deste trabalho, por saber ser brilhante e, ainda assim, acessível, e pelo carinho de amiga.

“O entusiasmo é uma aurora que nunca termina.”

À Professora Doutora **Themis Reverbel da Silveira** por ser a professora de todos nós, a mola mestra, a responsável pelo toque final, a pedra fundamental na construção da minha carreira académica.

Ao Professor Dr. **Afonso Luis Barth** pela disposição, por concordar em seguir adiante quando nada parecia funcionar, pelo profissionalismo e, especialmente, pelas incansáveis reuniões semanais que acabaram por mostrar que este estudo era possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a execução e a finalização deste estudo.

Em particular:

- ao Dr. Carlos Oscar Kieling, à Dra. Cristina Helena Targa Ferreira e à Dra. Helena Ayako Sueno Goldani pelos momentos dispensados com a correção deste estudo, pelas sugestões, pelos artigos do dia e pelo carinho que só grandes amigos são capazes de demonstrar;
- aos amigos Márcia Mocellin Raymundo e Hugo Raymundo Bordas pelos bons momentos de descontração e pela amizade incondicionais;
- às amigas, Dra. Raquel Borges Pinto, Dra. Maria Lúcia Zanotelli e Dra. Marília Bastos pelo estímulo constante e pela demonstração de afeto.
- às colegas Dra. Renata Gonçalves Rocha, Dra. Aline Friedrich de Souza, Dra. Ana Regina Ramos, Dra. Cristiane Hallal, Dra. Margarida Winkler, Dra. Luciana Célia e Dra. Danielle Müller Zaffonato pelo empenho na realização das paracenteses e no estoque das ascites;
- ao Adriano Taniguchi pela dedicação no processo de revisão dos prontuários médicos e na aquisição de grande parte da bibliografia;
- à Daniela Corriea e ao Hugo Pena Costa pela ajuda na realização da biologia molecular e especialmente pela boa vontade;
- à Vânia Naomi Hirakata pela colaboração na análise estatística e à professora Juçara Bueno Ricciardi pela revisão ortográfica e gramatical;
- ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, na pessoa do professor Sérgio Barros, pelas sugestões durante as apresentações deste estudo.
- à *Scientific* pelo trabalho cuidadoso na correção do inglês.
- às colegas do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Marta Regina Dotto, Eliane Reisdorfer e Rosa Lúcia Vieira Maidana pela ajuda inestimável com a burocracia.
- ao Dr. Amauri Braga Simonetti e ao Dr. Luciano Krug pela elaboração inicial do projeto de pesquisa.
- ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento do projeto.
- aos nossos pacientes por estimularem cada novo trabalho.

RESUMO

No grupo pediátrico, as principais causas de ascite são aquelas relacionadas à hipertensão do sistema porta, especialmente a cirrose de causas variadas. O desenvolvimento de ascite está associado a algumas complicações como a hiponatremia dilucional, a insuficiência renal funcional e a infecção da ascite. Na ausência de uma causa cirúrgica ou intra-abdominal de peritonite, distinguem-se duas formas principais de infecção da ascite: a peritonite bacteriana espontânea (PBE) e a bacteriascrite (BA). Define-se a PBE como aquela situação associada a uma contagem de polimorfonucleares (PMN) na ascite > 250 células/ μL . A BA é diagnosticada quando a cultura da ascite é positiva, na presença de uma quantidade de PMN na ascite ≤ 250 células/ μL . Como a cultura convencional da ascite mostra baixa sensibilidade, sua positividade não é necessária ao diagnóstico da PBE.

O advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem permitido a detecção de microrganismos em baixas concentrações, de cultivo exigente, demorado ou não disponível.

O objetivo geral deste estudo foi comparar os resultados do método de amplificação da subunidade 16S do gene rRNA com aqueles obtidos pela técnica de cultura automatizada (BACTEC 9240) no diagnóstico de PBE, em crianças e adolescentes com ascite por hipertensão porta (gradiente albumina soro-ascite $\geq 1,1$ g/dl), acompanhados na unidade de gastroenterologia pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foram estudados 31 pacientes e 40 paracenteses. A mediana da idade foi de 2,9 anos (intervalo interquartilico: 0,8-8,5 anos). Dezesesseis pacientes foram do sexo masculino. Vinte e quatro pacientes eram cirróticos e, destes, vinte foram classificados com Child-Pugh C. A mediana do escore PELD foi de 18,5 (intervalo interquartilico: 0,8 – 8,5 anos).

Aproximadamente, 10 mL de ascite foram inoculados, à beira do leito, em frascos de cultura, e incubados no sistema BACTEC 9240. Cerca de 20 mL da amostra foram enviados ao laboratório para a realização da coloração de Gram, para a análise bioquímica, para a contagem total e diferencial de células e para o estudo citopatológico. Simultaneamente, 10 a 30 mL de ascite foram estocadas a -20°C para detecção do DNA bacteriano.

Após extração do DNA com Trizol, a técnica de amplificação foi realizada utilizando-se *primers* para o gene 16S rRNA.

Houve 12 episódios de ascite infectada (8 PBE e 4 BA). A cultura foi positiva em 4/8 casos de PBE. A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) da cultura para o diagnóstico de PBE foram 50%; 87,5%, 50,0% e 87,5%, respectivamente. A técnica de amplificação do DNA bacteriano foi positiva em 7/8 casos de

PBE, em 3/4 casos de BA e em 8 casos que apresentavam ascite com cultura negativa e não neutrocítica (ACNNN). A sensibilidade, a especificidade, o VPP e o VPN da PCR no diagnóstico de PBE foram 85,7%, 65,6%, 38,8% e 95,5%, respectivamente. Os pacientes com ACNNN foram classificados de acordo com os resultados do DNA bacteriano e comparados em relação ao escore PELD, ao gradiente de albumina soro-ascite e à mortalidade em três meses. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Concluimos que o método molecular foi mais sensível do que o da cultura no diagnóstico de PBE, podendo se constituir em um teste de triagem dessa complicação. A detecção de DNA bacteriano em 8 pacientes com ACNNN suscita questões a respeito da utilidade do teste também no diagnóstico de BA.

ABSTRACT

Cirrhosis is the most important cause of portal hypertensive ascites in children. The development of ascites in these patients is related to several complications such as dilutional hyponatremia, functional renal failure and infection of ascites. In the absence of secondary bacterial peritonitis, there are two forms of infected ascites: spontaneous bacterial peritonitis (SBP) defined as a polymorphonuclear (PMN) cell count in ascites $> 250/\mu\text{L}$ and bacterascites (BA) defined as a positive ascites culture with a PMN count ≤ 250 cells/ μL . Because ascites culture is often negative, the positivity of ascites culture is not necessary to diagnose SBP.

The main applications of the polymerase chain reaction (PCR) include the detection of bacteria in low concentrations, fastidious bacterial pathogens and the detection of slowly growing bacteria.

The aim of this study was to compare the amplification of 16S rRNA gene with the BACTEC culture in the diagnosis of SBP, in pediatric patients with portal hypertension ascites (a serum to ascites albumin gradient ≥ 1.1 g/dL) attending the pediatric gastroenterology unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Thirty-one patients and forty paracentesis were studied. The median age of patients was 2.9 years (interquartílico range: 0.8-8.5). Sixteen patients were male. Cirrhosis of several causes was presented in 24 patients, 20 were classified as Child-Pugh C and the median of PELD score was 18.5 (interquartil range:10.0-27.5).

Bacterial aerobic and anaerobic cultures were obtained by bedside inoculation of 10 mL of ascitic fluid into culture bottles which were incubated in BACTEC 9240 culture system. A volume of 20 mL of ascites was send to laboratory for the biochemical analyses, Gram's stain, total and differential cell counts and cytology. Simultaneously, 10 to 30 mL of ascites was stored at -20°C to posterior bacterial DNA detection.

After DNA extraction, detection of bacterial DNA was performed using primers for 16S rRNA gene.

There were twelve episodes of infected ascites (8 SBP and 4 BA). Culture was positive in 4/8 cases of SBP. The molecular technique was positive in 7/8 cases of SBP and 3/4 cases of BA. For the diagnoses of SBP, the sensitivity, specificity positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of BACTEC culture was 50%, 87.5%, 50% and 87.5%, respectively. The sensitivity, specificity, PPV and NPV of bacterial DNA was 87.5%, 65.6%, 38.8% and 95.5%. Eight patients with culture-negative nonneutrocytic ascites (CNNNA) had positive bacterial DNA.

They are not different of those with CNNNA and negative bacterial DNA in respect of PELD score, serum to albumin ascites gradient or mortality in three month. In conclusion, the amplification of 16S rRNA gene was most sensitive than BACTEC culture in the diagnosis of SBP. The finding of positive bacterial DNA in patients with CNNNA indicates that the method could be useful in the diagnoses of BA as well.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Causas da ascite
- Quadro 2 - Alterações hemodinâmicas em pacientes com cirrose e ascite
- Quadro 3 - Situações que podem prejudicar a valorização diagnóstica do gradiente albumina soro – ascite
- Quadro 4 - Tipos de infecção da ascite: critérios diagnósticos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Patogênese da ascite: mecanismo da vasodilatação arteriolar esplâncnica
- Figura 2 - Reação em cadeia da polimerase
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Ascite	14
1.1.1 Histórico e definição	14
1.1.2 Causas de ascite em crianças e adolescentes	15
1.1.3 Fatores implicados na patogênese da ascite cirrótica	16
1.1.4 Diagnóstico.....	20
1.1.4.1 Clínico e radiológico	20
1.1.4.2 Paracentese e diagnóstico laboratorial	21
1.1.4.3 Gradiente de albumina soro-ascite	22
1.1.5 Complicações	23
1.2 Infecção da Ascite	25
1.2.1 Considerações Gerais	25
1.2.2 Definições	25
1.2.3 Prevalência e incidência	27
1.2.4 Fatores implicados na patogênese	28
1.2.5 Diagnóstico	29
1.2.5.1 Clínico	29
1.2.5.2 Laboratorial	30
1.3 Detecção de microrganismos por biologia molecular	32
1.3.1 Aspectos técnicos	32
1.3.2 Aplicação clínica	36
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	38
3. OBJETIVOS	39

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	40
4.1 Infected and Noninfected Ascites in Pediatric Patients	41
4.2 Amplification of bacterial 16S rRNA gene is more sensitive than BACTEC culture to diagnose spontaneous bacterial peritonitis	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	
ANEXO A – Consentimento Informado	93
ANEXO B – Ficha de Avaliação do Paciente	95
ANEXO C - Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados	99
ANEXO D - Características laboratoriais dos pacientes estudados	100
ANEXO E - Resultados das análises citológica e bioquímica das amostras de ascite estudadas.....	102
ANEXO F - Resultados dos testes de microbiologia e biologia molecular nas amostras de ascite estudadas.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASCITE

1.1.1 Histórico e definição

A palavra ascite é derivada da palavra grega *askos* que significa bolsa (Caldwell & Battle, 1999). Referências ao termo ascite ou dropsia datam da antiguidade, sendo ambas as palavras utilizadas para designar diferentes doenças caracterizadas por edema e aumento do volume abdominal (Caldwell & Battle, 1999). A associação entre ascite e doença do fígado foi reconhecida por volta dos anos 300ac por Erasistratus da Cappadocia (Arroyo & Bataller, 1999). A partir desse período, começam a aparecer os primeiros relatos sobre o tratamento da ascite (Arroyo e Bataller, 1999).

A ascite é definida como um aumento patológico de fluido na cavidade peritoneal (Runyon *et al*, 1998). Sua composição é muito semelhante à do plasma. Possui as mesmas quantidades de moléculas de baixo peso molecular e menores concentrações de proteínas e de moléculas ligadas às proteínas (Hoefs, 1999).

A concentração de proteínas na ascite é influenciada pela síntese protéica, pelo volume de distribuição das proteínas, pela rapidez de formação da ascite e pelo gradiente hidrostático (Hoefs, 1999). Outras situações que podem favorecer o deslocamento de proteínas do plasma para a cavidade peritoneal são aquelas relacionadas a uma maior permeabilidade da membrana peritoneal (determinada pela presença de citocinas e/ou toxinas) e a ruptura de órgãos ou de estruturas para o peritônio (Hoefs, 1999).

Em situações relacionadas à hipertensão do sistema porta, o gradiente hidrostático é o principal determinante da concentração de proteína na ascite. De uma maneira geral, quanto maior a pressão venosa porta, maior a pressão capilar intestinal e maior o deslocamento de fluido para o peritônio (Caldwell & Battle, 1999). Isso determina um estado de diluição das proteínas intraperitoneais.

Algumas substâncias são modificadas ou consumidas na cavidade peritoneal, enquanto outras são aí produzidas. Exemplos de substâncias consumidas na ascite incluem: o plasminogênio, o fibrinogênio, os fatores de coagulação e os componentes C3 e C4 do complemento. Certas condições como inflamação, infecção ou ruptura de órgãos podem determinar o aparecimento de substâncias específicas na ascite como: a desidrogenase láctica (infecção, tumores), os quilomícrons (ruptura de linfáticos), a bilirrubina (ruptura de via biliar), a amilase (pancreatite), o antígeno carcinoembrionário, a adenosina deaminase (tuberculose), entre outras (Hoefs, 1999).

1.1.2 Causas de ascite em crianças e adolescentes

Ascite pode ocorrer em todas as faixas etárias, desde o período neonatal até a vida adulta. A ascite congênita é rara, ocorrendo em aproximadamente 1:3000 gestações, e é, principalmente, devida a causas infecciosas e metabólicas (Balistreri, 1999).

Outras causas de ascite no grupo pediátrico são as doenças hepáticas, renais e cardíacas (quadro 1) . Como no paciente adulto, a hipertensão do sistema porta é uma causa importante de ascite na criança e no adolescente (McDiarmid, 2000; Arroyo & Colmenero, 2003). As principais causas de hipertensão porta neste grupo são: a cirrose de diferentes etiologias, a trombose de veia porta e a fibrose hepática congênita forma hipertensiva (Shneider, 2001; Pinto & Silveira, 2002). Desenvolvem ascite mais frequentemente aqueles pacientes com cirrose. Nestes, o espectro da doença pediátrica, no que se refere às causas, é muito diferente do da doença do adulto. Enquanto nos adultos o abuso de álcool e a hepatite viral são causas habituais de cirrose e ascite (Friedman, 1999; Mattos, 1994), no paciente pediátrico as principais causas são a atresia de vias biliares e as doenças genético-metabólicas (Shneider, 2001). A hepatite fulminante também em crianças pode se apresentar com ascite (Poddar *et al*, 2002).

Quadro 1: Causas de ascite em crianças e adolescentes

Relacionadas à hipertensão porta	Não relacionadas à hipertensão porta
<p>Intra-hepática</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cirrose - Fibrose hepática congênita - Insuficiência hepática - Doença veno-oclusiva - Esquistossomose - Doenças granulomatosas - Doenças mieloproliferativas - Neoplasias <p>Pós-hepática</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Budd-Chiari - Pericardite constrictiva - Obstrução da veia cava inferior - Insuficiência cardíaca congestiva 	<p>Intestinais</p> <ul style="list-style-type: none"> - Infarto intestinal - Perfuração intestinal - Linfangiectasia intestinal <p>Pancreáticas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pancreatite - Ruptura do ducto pancreático <p>Renais</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome Nefrótica - Uropatia obstrutiva - Perfuração do trato urinário <p>Ginecológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumores ovarianos - Torção ou ruptura de ovário <p>Outras</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perfuração de via biliar - Carcinoma peritoneal - Lúpus eritematoso sistêmico - Hipotireoidismo - Infecção peritoneal

1.1.3 Fatores implicados na patogênese da ascite cirrótica

No fígado cirrótico, existem anormalidades circulatórias características, que são determinadas pela presença de fibrose e pela deposição de colágeno no espaço sinusoidal com conseqüente diminuição da sua permeabilidade (Cárdenas, 2001). Essas alterações estruturais se refletem nas circulações sistêmica e esplâncnica como diminuição da resistência vascular e hipotensão arterial sistêmicas, aumento do débito cardíaco e ativação de sistemas vasoconstritores e antinatriuréticos (quadro 2). As alterações hemodinâmicas da cirrose têm

sido demonstradas tanto em estudos clínicos quanto em estudos experimentais (Ginés *et al*, 1997; Schrier *et al*, 1994).

A teoria da vasodilatação arterial periférica (Fig. 1), que será discutida a seguir, foi descrita há mais de uma década e, provavelmente, é a que melhor relaciona os distúrbios circulatórios da cirrose à formação de ascite e ao desenvolvimento progressivo de disfunção renal (Arroyo & Colmenero, 2003).

Em indivíduos saudáveis, o aumento da ingestão de sódio é rapidamente compensado por um aumento na sua excreção renal. Na maioria dos estados edematosos, ocorre um desequilíbrio desse mecanismo e o sódio é retido, a despeito da expansão progressiva do volume plasmático e do fluido extracelular. Na teoria da vasodilatação periférica, a retenção de sódio observada no cirrótico é uma resposta renal ao hipofluxo periférico (Cárdenas, 2001). A hipertensão porta sinusoidal parece ser o evento desencadeante. Promove o desenvolvimento progressivo de vasodilatação arteriolar esplâncnica, hipofluxo e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, do sistema nervoso simpático e hipersecreção não osmótica do hormônio antidiurético (Arroyo & Colmenero, 2003) que desencadeiam uma resposta vasoconstritora compensatória, cujo resultado final é a retenção renal de sódio e água. Nos estágios iniciais da doença, quando a vasodilatação arteriolar esplâncnica é moderada e o sistema linfático consegue "devolver" para a circulação sistêmica um maior volume de linfa, o hipofluxo arteriolar é compensado por períodos transitórios de retenção de sódio. A absorção renal de sódio e água aumenta o volume plasmático, suprimindo o estímulo à antinatriurese. À medida que a doença progride, aumentam a vasodilatação arteriolar esplâncnica e a conseqüente retenção renal de sódio e de água, como resposta a um continuado estímulo sistêmico vasoconstritor. O fluido retido nessa situação excede a capacidade de drenagem linfática e vasa para a cavidade peritoneal como ascite e/ou para o interstício como edema (Arroyo & Colmenero, 2003).

Os pacientes cirróticos com ascite e intensa retenção renal de sódio (< 10 mEq/L/dia), com hiponatremia dilucional (sódio sérico < 130 mEq/L), com baixa pressão arterial média e com marcada ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (atividade de renina plasmática elevada) e do sistema nervoso simpático (norepinefrina plasmática elevada) são pacientes em alto risco de desenvolvimento da síndrome hepato-renal, evento final dessa cascata de hipofluxo e vasoconstrição (Cárdenas, 2001; Arroyo & Colmenero, 2003).

Quadro 2: Alterações hemodinâmicas em pacientes com cirrose e ascite

Circulação Hepática
Resistência aumentada ao fluxo sanguíneo Diminuição da permeabilidade sinusoidal Produção elevada de substâncias vasoconstritoras Produção intra-hepática reduzida de óxido nítrico
Circulação Esplâncnica
Pressão venosa portal elevada Vasodilatação arteriolar esplâncnica Pressão capilar intestinal elevada Desenvolvimento de circulação portossistêmica colateral
Circulação Sistêmica
Volume arterial sistêmico diminuído Débito cardíaco diminuído Resistência vascular sistêmica reduzida Hiperatividade dos sistemas vasoconstritores Hipotensão arterial

Fonte: Cárdenas A, 2001

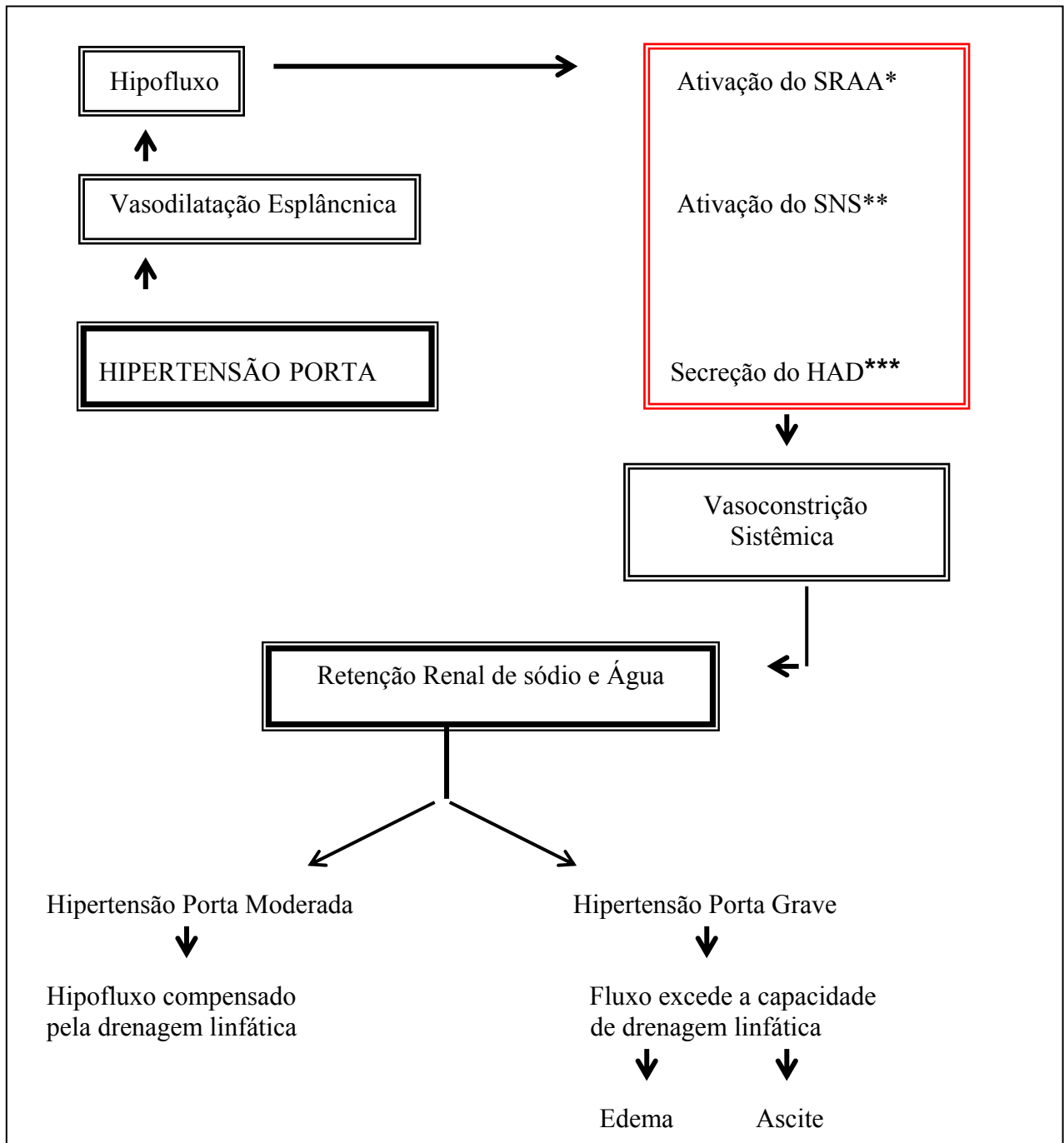


Fig. 1: Patogênese da Ascite: mecanismo da vasodilatação arteriolar esplâncnica
 (* Sistema renina-angiotensina-aldosterona; ** Sistema Nervoso Simpático; *** Hormônio Antidiurético)

1.1.4 Diagnóstico

1.1.4.1 Clínico e radiológico

O aparecimento de ascite pode ser lento e insidioso ou súbito. Este último está habitualmente associado às situações que determinam queda súbita da função hepática como hemorragia digestiva, choque, infecção ou trombose venosa aguda (Hardy & Kleinman, 2001). Na maioria das vezes, o evento segue o curso progressivo da doença descrito anteriormente.

Diferente do que é observado no cirrótico adulto, as crianças com ascite raramente terão edema periférico associado e a primeira indicação da existência de ascite poderá ser ganho de peso inapropriado. Presença de área de macicez móvel ou do sinal de piparote (palpação de onda líquida) podem ser sinais de difícil avaliação no paciente muito pequeno e com volumes moderados de ascite. À medida que ocorre aumento do volume da ascite, são observados: distensão abdominal proeminente, edema escrotal ou vulvar e desconforto respiratório com ou sem derrame pleural. O paciente com ascite de início muito agudo, pode apresentar-se desidratado como resultado de rápida depleção vascular sistêmica (Hardy & Kleinman, 2001).

Sinais de ascite que podem ser observados à radiografia simples de abdome são: deslocamento e separação das alças intestinais e presença de líquido em flancos, pelve, hipocôndrio direito e esquerdo (Hardy & Kleinman, 2001). Bundrick *et al* estudaram a sensibilidade e a especificidade da radiografia simples de abdome para o diagnóstico de ascite, utilizando a ultra-sonografia como padrão-ouro. Em 100 casos estudados a sensibilidade do exame foi de 84% e a especificidade de 70% (Bundrick *et al*, 1984).

A ultra-sonografia abdominal é um método sensível para o diagnóstico de ascite (Hardy & Kleinman, 2001). Coleções de ascite podem ser visualizadas na pelve, nas goteiras parieto-cólicas e circundando o fígado ou o baço (Hardy & Kleinman, 2001).

A adição do doppler em cores confere uma melhor especificidade ao método convencional de ultra-sonografia (von Herbay & Haussinger, 2002). Permite, por exemplo, o diagnóstico diferencial da presença de ecos dentro da ascite, que podem ocorrer tanto na presença de ascite hemorrágica quanto na presença de malignidade, em que o componente peritoneal vascular poderá estar aumentado (Dinkel *et al*, 1984). O estudo do índice de resistência da artéria renal pelo doppler tem recentemente mostrado ser um método útil para avaliar a gravidade da disfunção renal em pacientes com ascite cirrótica (Rendon *et al*, 2001) e para estimar o risco de desenvolvimento de síndrome hepato-renal (Bardi *et al*, 2002).

A tomografia computadorizada (TC) não é um método necessário para o diagnóstico de ascite, e seu uso parece limitar-se à determinação da causa da ascite em algumas situações específicas. Andronikou *et al* sugerem a realização de TC como método diagnóstico adicional em casos suspeitos de tuberculose abdominal. (Andronikou *et al*, 2002).

1.1.4.2 Paracentese e diagnóstico laboratorial

Na década de 80, Runyon demonstrou a segurança da realização da paracentese. Em 229 paracenteses, observou apenas duas complicações importantes relacionadas ao desenvolvimento de hematoma de parede com necessidade de transfusão (Runyon, 1986).

Na última reunião de consenso do Clube Internacional de Ascite, publicada recentemente, foi proposta a realização de paracentese diagnóstica em todos os pacientes com ascite, mesmo quando houver suspeita de cirrose (Moore *et al*, 2003). Nos cirróticos, paracentese única ou seriada está indicada em todos os pacientes com ascite recente, admitidos em hospitais ou em descompensação clínica (Rimola *et al*, 2000).

Não existem contra-indicações absolutas à paracentese (Moore *et al*, 2003). O método deve ser realizado com cuidado em pacientes com história prévia de cirurgia abdominal e naqueles com ascite loculada. Trombocitopenia importante (concentrações de plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$) e coagulopatia são contra-indicações relativas (Moore *et al*, 2003).

O material, coletado à beira do leito, deverá ser enviado para citologia, bioquímica e microbiologia, sendo, em algumas situações, necessário o estudo da relação soro-ascite para melhor definição diagnóstica (Moore *et al*, 2003; Rimola *et al*, 2000).

O aspecto celular da ascite pode ser avaliado tanto por citologia quanto por contagem diferencial de células. A citologia é um método muito efetivo para o diagnóstico de ascite secundária à malignidade peritoneal, apresentando uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100% (Abillos *et al*, 1990). A contagem diferencial de células poderá demonstrar a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN), mononucleares (linfócitos, monócitos, macrófagos) e células mesoteliais, em concentrações variáveis. Raramente revelará a presença de células anormais como eosinófilos. (Hoefs, 1999).

Habitualmente, a contagem de PMN é menor que 250 células/ μL e a concentração de linfócitos é menor que 200 células/ μL (Runyon, 1986). Esses elementos poderão estar elevados em quaisquer situações que promovam um estímulo quimiotático dentro da cavidade peritoneal, como nos casos de peritonite bacteriana espontânea. Os monócitos podem estar elevados na presença de infecção por *Listeria monocytogenes*, e o aumento do número de

macrófagos pode ser observado seguindo o uso crônico de diuréticos (Hoefs, 1999). Os PMN não se alteram com o uso de diurético por causa de sua curta meia-vida (Hoefs *et al*, 1981).

A concentração de glicose na ascite varia de acordo com algumas situações: jejum, infecção e malignidade. No estado de jejum, a concentração de glicose é a mesma do soro, com uma relação soro/ascite de 1,0. Após uma refeição rica em glicose, na infecção e na carcinomatose peritoneal, a concentração de glicose na ascite diminui. No estado pós-prandial, a relação ascite-soro é de 0,8 (Hoefs, 1999). Tanto nas situações associadas à infecção ou à carcinomatose, observa-se, respectivamente, elevação do metabolismo peritoneal de glicose e maior consumo por células tumorais (Hoefs, 1999). Como a glicose consumida é metabolizada em duas moléculas de ácido láctico, essas mesmas condições promovem na ascite queda do pH e elevações do lactato e da desidrogenase láctica .

Alguns parâmetros bioquímicos da ascite podem ser de grande utilidade no que se refere ao diagnóstico etiológico da ascite, como, por exemplo, a determinação das atividades da adenina deaminase na peritonite tuberculosa (Voight *et al*, 1989); amilase na ascite pancreática (Runyon, 1987), concentrações de colesterol em situações de malignidade, triglicerídeos na ascite quilosa (Hoefs, 1999) e bilirrubina na ruptura biliar (Hoefs, 1999), dentre outras.

As características microbiológicas bem como outros critérios para infecção serão apresentados no item 1.2: infecção da ascite.

1.1.4.3 Gradiente de albumina entre o soro e a ascite (GASA)

Em situações de hipertensão porta, a pressão hidrostática vascular elevada promove o deslocamento de líquido para o peritônio, elevando a concentração de proteína dentro do vaso, determinando assim, um gradiente coloidosmótico entre o soro e a ascite. Como a albumina é a principal proteína encontrada no soro, a sua concentração reflete diretamente a pressão coloidosmótica sérica.

O GASA, definido como a diferença entre as concentrações da albumina do soro e da ascite, é um importante método utilizado para diferenciar a ascite por hipertensão porta daquelas relacionadas a outras causas como, por exemplo, malignidade e inflamação (Such *et al*, 1999). Os valores de GASA maiores ou iguais a 1,1 g/dL caracterizam hipertensão porta (Moore *et al*, 2003). Na experiência de Runyon *et al* (1992) esse gradiente identificou corretamente 97% dos casos de ascite relacionadas à hipertensão porta.

O GASA parece, também, refletir o grau de hipertensão do sistema porta (Mene *et al*, 2003; Das *et al*, 2001). Em nosso meio, Dittrich *et al* demonstraram uma correlação

significativa entre o GASA e os gradientes de pressão venosa do sistema porta em 37 pacientes adultos com ascite de causas variadas (Dittrich *et al*, 2001)

Apesar da determinação do GASA ser um método de fácil execução, alguns cuidados devem ser tomados quando da sua interpretação. Algumas situações, se não conhecidas ou controladas, podem prejudicar a interpretação do GASA e subestimar o seu valor diagnóstico (quadro 3).

Quadro 3: Situações que podem prejudicar a valorização diagnóstica do gradiente albumina soro – ascite

- Amostras de soro e ascite coletadas em diferentes momentos
- Ascites mistas
 - a) Hepatopatia crônica + síndrome nefrótica
 - b) Hepatopatia crônica + tuberculose peritoneal
 - c) Hepatopatia crônica + enteropatia perdedora de proteína
 - d) Outras
- Hipotensão
- Cirurgia

Fonte: Hoefs, 1999

1.1.5 Complicações da ascite

Recentemente, o Clube Internacional de Ascite propôs a classificação da ascite em ascite não complicada de variadas intensidades e ascite refratária (Moore *et al*, 2003).

A ascite é considerada não complicada quando não está infectada nem associada à síndrome hepato-renal (Moore *et al*, 2003). A ascite não complicada pode ser ainda subclassificada em ascite grau 1, somente detectável por ultra-sonografia; ascite grau 2, manifestada por moderada distensão simétrica do abdome e ascite grau 3, associada à importante distensão abdominal (Moore *et al*, 2003).

O conceito de ascite refratária permanece como descrito em 1996 e refere-se àquela situação em que a ascite não pode ser mobilizada ou recidiva precocemente (Arroyo *et al*, 1996). Os critérios para o diagnóstico de ascite refratária, entretanto, foram revisados e, atualmente,

incluem: pacientes em tratamento diurético intensivo (400 mg de espironolactona e 160 mg de furosemida) por no mínimo uma semana e que não respondem ao tratamento clínico, que apresentam recorrência precoce da ascite e que apresentam complicações induzidas pelo uso de diuréticos, tais como encefalopatia hepática e distúrbios eletrolíticos. Considera-se não resposta ao tratamento clínico uma perda ponderal inferior a 0,8 Kg em até quatro dias e excreção urinária de sódio menor que a ingestão. Recorrência precoce significa reaparecimento de ascite graus 2 ou 3 dentro de quatro semanas da mobilização inicial (Moore *et al*, 2003). Para aqueles que desenvolvem ascite refratária, a mortalidade se aproxima de 50% em 6 meses (Arroyo *et al*, 1996).

As principais complicações relacionadas à ascite cirrótica referem-se ao desenvolvimento da síndrome hepato-renal, à hiponatremia dilucional e à infecção da ascite.

Três importantes anormalidades funcionais renais são observadas no paciente cirrótico: a incapacidade de excreção renal de sódio e de água livre, a redução da perfusão renal e a diminuição da taxa de filtração glomerular (Arroyo & Colmenero, 2003). O curso do acometimento renal é habitualmente progressivo, mas ainda pode ser transitório ou estável (Such *et al*, 1999).

A síndrome hepato-renal é uma insuficiência renal funcional secundária à importante hipoperfusão renal (Arroyo & Colmenero, 2003). Classifica-se em dois tipos, de acordo com a intensidade da hipoperfusão e a forma de apresentação da insuficiência renal.

A síndrome hepato-renal tipo 1 (SHR-1) é, clinicamente, caracterizada pelo desenvolvimento de insuficiência renal progressiva, e, laboratorialmente, pelas concentrações séricas de creatinina superiores a 2,5 mg/dL em até duas semanas (Arroyo & Colmenero, 2003). São fatores precipitantes da SHR-1: o sangramento digestivo, a infecção bacteriana grave, os procedimentos cirúrgicos ou a hepatite viral superimposta à cirrose (Arroyo & Colmenero, 2003).

A SHR tipo 2 (SHR-2) é uma forma menos grave de insuficiência renal do cirrótico, caracterizada por uma diminuição moderada e estável da função renal na ausência de outras causas de insuficiência renal. A concentração de creatinina encontra-se entre 1,5 a 2,5 mg/dL (Arroyo & Colmenero, 2003).

A hiponatremia dilucional ocorre em pacientes com importante diminuição da excreção de água livre e é secundária à hipovolemia sistêmica (Moore *et al*, 2003).

A seguir discutiremos, mais detalhadamente, a infecção da ascite.

1.2 Infecção da Ascite

1.2.1 Considerações Gerais:

A infecção da ascite é reconhecida há mais de um século, tendo sido responsabilizada pela morte de pessoas famosas como Ludwig van Beethoven (Arroyo & Bataller, 1999). Só há cerca de 40 anos, entretanto, essa entidade foi devidamente descrita por Conn e Fessel (Conn & Fessel, 1964). Como esses pacientes não tinham uma fonte cirúrgica que justificasse a peritonite, essa infecção foi denominada de peritonite bacteriana espontânea (PBE). Ainda durante a década de 70, aparece um novo relato de peritonite espontânea em cirróticos (Curry *et al*, 1974). Era considerada como um evento raro, e a mortalidade aproximava-se de 80% (Conn & Fessel, 1971; Curry *et al*, 1974).

A partir da década de 80, começam a surgir estudos referentes a esse tema (Hoefs *et al*, 1982; Runyon, 1984; Almdal *et al*, 1987; Rimola, 1987; Runyon 1988). Ressaltam-se a descrição da ascite neutrocítica como uma variante da PBE (Runyon e Hoefs, 1984), as publicações sobre a segurança da realização da paracentese (Runyon, 1986) e a otimização do método de cultura da ascite (Runyon *et al*, 1988).

Em reunião do Clube Internacional de Ascite, no ano de 2000, foram publicadas normas visando uniformizar o diagnóstico, o tratamento e a profilaxia dessa entidade clínica (Rimola *et al*, 2000).

No final do ano de 2002, surge a primeira publicação sobre a aplicação da biologia molecular em pacientes com ascite não neutrocítica, cultura negativa (Such *et al*, 2002) e, neste ano, Castelotti *et al* relatam sua experiência com o uso de fitas-reagentes para a estearase leucocitária no diagnóstico de PBE (Castellote *et al*, 2003).

1.2.2 Definições

De acordo com os resultados da cultura da ascite e da contagem de polimorfonucleares (PMN), definem-se quatro variantes de ascite infectada (quadro 4): peritonite bacteriana espontânea, peritonite bacteriana-cultura negativa (ou ascite neutrocítica), bacteriascrite e peritonite bacteriana secundária (Such *et al*, 1999). As três primeiras situações ocorrem na ausência de uma fonte intra-abdominal cirúrgica de peritonite. Classicamente, a PBE é definida como a infecção do líquido de ascite em que se observa positividade da cultura e um número de leucócitos PMN maior ou igual a 250 células por microlitro (Such *et al*, 1999). A peritonite bacteriana-cultura negativa (PB-CN) ou ascite neutrocítica é considerada quando não se observa crescimento bacteriano na cultura, e a

quantidade de PMN é maior ou igual a 250 células por microlitro. Entretanto, a reunião de consenso do Clube Internacional de Ascite propõe o uso do termo PBE nas situações de PB-CN, em analogia ao que acontece em outras situações clínicas como, por exemplo, a meningite (Rimola *et al*, 2000).

A bacteriascite (BA) é a situação de infecção da ascite em que existe positividade da cultura, e o número de PMN é menor do que 250 células por microlitro (Rimola *et al*, 2000). Refere-se à colonização da ascite na ausência de reação inflamatória peritoneal.

A peritonite bacteriana secundária (PBS) é aquela relacionada a uma fonte intra-abdominal cirúrgica como abdome agudo infeccioso, perfuração abdominal, infecção de parede ou cirurgia abdominal prévia. A PBS deve ser suspeitada na presença de não resposta ao esquema antimicrobiano utilizado; na identificação de mais de um microorganismo na cultura e na presença de no mínimo dois dos seguintes achados no líquido de ascite: concentração de glicose < 50 mg/dL, concentração de proteína > 1,0 g/dL e atividade de desidrogenase láctica (LDH) ascite acima dos valores normais de referência dessa enzima (Rimola *et al*, 2000).

Quadro 4: Tipos de infecção da ascite: critérios diagnósticos

TIPO DE INFEÇÃO DA ASCITE	Nº DE PMN/μL	RESULTADO DA CULTURA
Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE)	> 250	Positiva (monobacteriana)
Peritonite Bacteriana- Cultura Negativa*(PB-CN)	> 250	Negativa
Bacteriascite (BA)	≤ 250	Positiva (monobacteriana)
Peritonite Bacteriana Secundária (PBS)	> 250	Positiva (polibacteriana)

* pode-se usar o termo PBE nos casos de PB-CN (Rimola *et al*, 2000)

PMN = polimorfonucleares

1.2.3 Prevalência e incidência

Com o uso rotineiro da paracentese, a PBE deixou de ser considerada um evento raro. Os resultados da prevalência e/ou incidência dessa entidade clínica estão na dependência dos critérios utilizados para o diagnóstico e da procedência dos pacientes estudados. Os pacientes não hospitalizados parecem ter uma prevalência menor de infecção da ascite (Evans *et al*, 2003).

A PBE com cultura positiva é diagnosticada em cerca de 3,5% a 30% de pacientes cirróticos adultos hospitalizados com ascite, e é particularmente freqüente na cirrose descompensada (Hurwich *et al* 1993, Kaymagoclu *et al* 1997, Chu *et al* 1995, Rimola, 1987). A prevalência de PBE com cultura negativa encontra-se entre 2,6% e 32,0% (Hurwich *et al* 1993; Runyon, e Antillon,1991). A ocorrência de BA na literatura é também muito variável: situa-se entre 1% e 10,8% (Hurwich *et al*, 1993; Chu *et al*, 1995).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, com pacientes adultos ambulatoriais e hospitalizados, a prevalência de PBE foi de 24%, de PB-NC foi igual a 66% e de BA foi de 10% (Figueiredo *et al*, 1999).

Com base nos resultados da contagem de PMN na ascite maior que 250 células por microlitro, a prevalência de PBE em pacientes adultos hospitalizados, no nosso meio, durante o período de 1991 a 2000, foi de 11,1% (Coral *et al*, 2002). Essa prevalência foi semelhante àquela observada pelo mesmo grupo no período de 1976 a 1990 (Mattos, 1992).

No que se refere à incidência da infecção da ascite, esta parece situar-se em torno de 20% (Almdal & Skinhoj, 1987). No nosso meio, Mattos demonstrou uma incidência de PBE de 31%, de PB-CN de 37% e de BA de 32% (Mattos, 1994), semelhante àquela observada por outros autores (Runyon & Antillon, 1991; Runyon & Hoefs, 1984; Pinzelo *et al* 1983).

A PBS pode estar presente em 2% a 5% de todos os pacientes cirróticos (Pinzelo *et al*, 1983; Rimola *et al*, 2000).

No único estudo envolvendo pacientes pediátricos cirróticos do qual temos conhecimento, a incidência total de PBE foi de 17,5%, (9% em pacientes com deficiência de alfa 1 anti-tripsina, 7% em hepatite autoimune, 1% em atresia biliar e 0,5% em hepatite criptogênica). (Larcher *et al*, 1985).

1.2.4 Fatores implicados na patogênese

A patogênese da PBE cirrótica ainda não está bem estabelecida. As rotas prováveis para que a bactéria tenha acesso ao peritônio ainda não estão bem definidas, mas o freqüente isolamento de microorganismos entéricos sugere que o intestino é a mais provável fonte da infecção (García-Tsao, 2001).

O mecanismo de translocação bacteriana tem sido implicado como o principal responsável pela infecção da ascite (Llovet *et al*, 1998; Ramachandran & Balasubramanian, 2001; Chiva *et al*, 2002; Solá & Soriano, 2002;). É definida como a passagem de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos e outros sítios extra-intestinais (García-Tsao, 2001). Sugere-se que a instalação de bactérias no fluido ascítico seja o resultado da transferência destas para a circulação sistêmica via ducto torácico (Solá & Soriano, 2002).

A translocação bacteriana já foi demonstrada tanto em estudos experimentais quanto clínicos. Em ratos cirróticos com ascite, a prevalência de translocação bacteriana varia de 37% a 83% (Llovet *et al*, 1998; Guarner *et al*, 1997; García-Tsao *et al*, 1995; Pérez-Paramo *et al*, 2000). Cirera *et al* (2001) observaram uma prevalência de 20% de translocação bacteriana em adultos cirróticos submetidos a transplante ortotópico de fígado ou ressecção de carcinoma hepatocelular.

Alguns fatores locais e/ou sistêmicos parecem predispor o cirrótico à colonização da ascite por bactérias. Dentre esses, ressaltam-se: supercrescimento bacteriano intestinal (Bauer, 2002), lesões oxidativas na mucosa intestinal (Chiva *et al*, 2003) e alterações imunológicas próprias do cirrótico (Chang, 2001; Rimola *et al*, 1984). A desnutrição, a baixa concentração de opsoninas e fibronectina no líquido de ascite (García-Tsao, 2001; Solá, 2002), a diminuição da atividade bactericida sérica (García-Tsao, 2001), as deficientes quimiotaxia (Solá, 2002) e fagocitose em leucócitos e macrófagos são apontados como possíveis fatores colaboradores no estabelecimento de translocação bacteriana e de infecção da ascite. Em nosso meio, Almeida (1994) demonstra uma diminuição dos níveis de IgG, IgM, C3 e C4 no líquido de ascite de pacientes com hepatopatia crônica de etiologia alcoólica (Almeida, 1994).

No que diz respeito ao patógeno envolvido, sabe-se que em 90% dos casos de PBE a infecção é causada por um único tipo de microorganismo, e 60% a 80% são devidos a bactérias aeróbicas gram negativas, entre as quais *E. coli* é a predominante no grupo de pacientes adultos (Abillos *et al*, 1990, Mattos, 1994; Thanopoulou *et al*, 2002; Chu *et al*, 1995;). Cocos gram positivos, particularmente *S. pneumoniae*, são encontrados em 10% a

53% dos casos em adultos (Coral *et al*, 2002; Dinis-Ribeiro *et al*, 2002; Dalmau *et al*, 1999; Fernández *et al*, 2001), mas correspondeu a 82% da casuística pediátrica (Larcher *et al*, 1995). Anaeróbios compreendem aproximadamente 5% e são mais frequentemente isolados quando existe peritonite bacteriana secundária (Titó *et al*, 1988).

Outros organismos cultivados no líquido de ascite incluem: *Salmonella* sp (de la Fuente-Aguado *et al*, 1999); *Listeria monocytogenes* (Nolla-Salas *et al*, 2002), *Streptococcus bovis* (Vilaichone *et al*, 2002), *Haemophilus influenzae* (Cereto *et al*, 2002), *Campylobacter* sp (Raventos *et al*, 2002) e *Enterococcus gallinarum* (Alvarez *et al*, 2002).

1.2.5 Diagnóstico

1.2.5.1 Clínico

Classicamente, a infecção da ascite, quando sintomática, caracteriza-se pelo início abrupto de febre, calafrios, dor abdominal, motilidade intestinal alterada e leucocitose (Rimola *et al*, 2000). A dor abdominal e a febre são os sintomas mais prevalentes (Such *et al*, 1999), no entanto, sintomas inespecíficos como hemorragia digestiva, encefalopatia hepática, insuficiência renal, febre ou choque séptico podem ocorrer (Rimola *et al*, 2000; Coral *et al*, 2002).

A infecção sintomática da ascite parece ser mais prevalente nos casos com PBE do que naqueles com BA. Na casuística de Coral *et al* (2002), os sinais e os sintomas mais frequentemente observados de PBE foram a dor abdominal (74,6%), a febre (57,9%) e a encefalopatia hepática (42,8%). Em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, Larcher *et al* observaram manifestações clínicas semelhantes às da população adulta (Larcher *et al*, 1985). Aproximadamente 2,5% a 18% dos pacientes com PBE são assintomáticos (Chu *et al*, 1995; Coral *et al*, 2002; Thanopoulou *et al*, 2002).

Os pacientes com BA não constituem um grupo homogêneo. Enquanto em alguns a positividade da cultura do líquido de ascite se dá no curso de uma infecção extraperitoneal, em outros, o crescimento bacteriano parece corresponder à colonização espontânea do líquido de ascite. Estes últimos podem ser assintomáticos ou podem apresentar sintomas semelhantes aos daqueles com PBE (Chu *et al*, 1999, Runyon, 1990; Rimola *et al*, 2000).

1.2.5.2 Laboratorial

O diagnóstico de ascite infectada é fundamentalmente laboratorial. Envolve características citológicas, bioquímicas e microbiológicas do líquido de ascite.

Tanto a contagem total quanto a contagem diferencial de leucócitos no líquido de ascite foram utilizadas como métodos diagnósticos de ascite infectada (Such *et al*, 1999).

O número de leucócitos totais está sujeito a resultados falsos positivos como, por exemplo, no curso de tratamento diurético, e não é atualmente recomendado (Rimola *et al*, 2000). Por outro lado, os níveis de polimorfonucleares no líquido de ascite parecem mostrar uma boa correlação com a existência de infecção. Valores ≥ 250 polimorfonucleares/ μL têm uma boa sensibilidade, enquanto que maiores especificidades são alcançadas com valores ≥ 500 polimorfonucleares/ μL (Abillos *et al*, 1990). Há, no entanto, que se excluir a presença de tuberculose peritoneal, pancreatite e carcinomatose peritoneal (Such *et al*, 1999), causas de ascite neutrocítica.

A última reunião de consenso do Clube Internacional de Ascite recomenda que o diagnóstico de PBE tenha por base um número de PMN na ascite superior a 250 células por microlitro (Rimola *et al*, 2000). Em pacientes com ascite hemorrágica (mais de 10.000 hemáceas por mm^3), deve-se subtrair um PMN de cada 250 hemáceas (Rimola *et al*, 2000). De acordo com esse consenso, uma quantidade de PMN na ascite menor que 250 células por microlitro exclui o diagnóstico de PBE (Rimola *et al*, 2000).

Algumas características bioquímicas do líquido de ascite foram utilizadas no diagnóstico de peritonite bacteriana. Os valores de pH, a atividade de desidrogenase láctica e as concentrações de glicose, de proteínas totais e de lactato foram exaustivamente estudados (Attalli *et al*, 1986; García-Tsao *et al*, 1985; Gitlin *et al*, 1982; Mattos, 1994; Yang *et al*, 1995; Thanopoulou *et al*, 2002), mas os resultados não foram uniformes, o que dificulta estabelecer padrões de infecção com esses parâmetros. Na nossa própria experiência, a análise do pH no líquido de ascite de pacientes com suspeita de PBE não diferenciou pacientes com PBE, BA ou ascite não infectada (Vieira *et al*, 2002). A determinação das concentrações na ascite de proteínas totais, glicose e atividade de desidrogenase láctica parece ser de utilidade na diferenciação entre a PBS e a PBE (Rimola *et al*, 2000).

O diagnóstico microbiológico da PBE e da BA se baseia no exame bacterioscópico (coloração de Gram) e no exame bacteriológico convencional. Os resultados com o exame bacterioscópico da ascite pela coloração de Gram acrescentam pouco ao diagnóstico de ascite infectada (Moore *et al*, 2003), já que apenas 10 a 40% de organismos são detectáveis na ascite

pelo Gram (Crossley & Williams, 1985; Hoefs & Runyon, 1985; Mattos, 1994). Isso se justifica pela baixa sensibilidade desse método no diagnóstico de infecção em amostras com pequenas quantidades de bactérias, como é o caso da ascite (Such *et al*, 1999).

As técnicas bacteriológicas utilizadas para detecção de bactérias na ascite são o cultivo em meios de cultura sólido e líquido. Runyon *et al*, no final da década de 80, demonstrou que a incidência de resultados negativos diminuía consideravelmente quando se utilizava uma quantidade de líquido de ascite de no mínimo 10 ml e se inoculava este volume em frasco de hemocultura, à beira do leito, incubando-se o material por 5 a 7 dias (Runnyom *et al* 1988). Esse método é descrito como método de cultura otimizado para o diagnóstico de PBE. Na experiência desses autores, a positividade da cultura, realizada dessa maneira, se elevou para 93% (Runyon *et al*, 1988). Mesmo com o uso do método de cultura otimizado, fora de ensaios clínicos, a positividade da cultura situa-se em torno de 20-40% (Mattos, 1994; Thanopoulou *et al*, 2002; Coral *et al*, 2002; Rubinstein *et al*, 2001). Deste modo, é consenso recente que a cultura convencional não é um bom método para o diagnóstico de infecção da ascite não sendo sua positividade necessária para justificar o tratamento em pacientes suspeitos (Rimola *et al*, 2000).

Prossegue na literatura, a busca por melhores métodos para o diagnóstico de infecção da ascite. O papel de mediadores pró-inflamatórios endógenos, tem sido motivo de algumas publicações. Acredita-se que esses mediadores possam ser marcadores precoces de infecção e bons indicadores prognósticos. Os níveis de interleucina-6, de pró-calcitonina e da atividade da proteína C reativa foram estudados em pequenos grupos de pacientes com cirrose e ascite. Os resultados desses testes, no entanto, não são uniformes. Enquanto as altas concentrações da interleucina-6 foram demonstradas em alguns estudos (Devière *et al*, 1991; Propst *et al*, 1993; Pruiboon *et al*, 1995), Spahr *et al* (2001) não observaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores dessa citocina quando compararam as ascites infectadas e as não infectadas. Os mesmos resultados contraditórios são observados quando da análise dos resultados de Sparh *et al* (2001) e aqueles de Viallon *et al* (2000) referentes aos níveis de pró-calcitonina.

Considerando que o elemento chave para o diagnóstico de PBE é a presença de leucócitos, Castellote *et al* realizaram um estudo comparativo entre os critérios atualmente recomendados para o diagnóstico de PBE e o uso da fita-teste para detecção da estearase leucocitária habitualmente utilizada no diagnóstico de infecção urinária (Castellote *et al*, 2003). Esses autores observaram uma sensibilidade de 96%, uma especificidade de 89% e valores preditivos positivos e negativos iguais a 74% e 99%, respectivamente. A utilização

desse método parece promissora principalmente por ser de simples execução e de grande disponibilidade (Runyon, 2003). Entretanto, cabe ressaltar que a ausência de estearase leucocitária, não exclui a possibilidade de BA.

1.3 Detecção de Microrganismos por Biologia Molecular

1.3.1 Aspectos técnicos

De acordo com Hausmann (1997), a identificação da estrutura do DNA por Watson & Crick, em 1953, é a descoberta mais significativa da história da biologia. Algumas características dessa estrutura, já conhecidas na década de 50, são atualmente a base da biologia molecular. Dentre estas destaca-se o conhecimento de que em elevadas temperaturas, a energia cinética das moléculas do DNA se eleva a ponto de dissolver as pontes de hidrogênio entre as duas fitas e individualizá-las. Quando a temperatura é lentamente diminuída, essas fitas se “reencontram” e, no momento em que as seqüências de bases complementares se unem, novas pontes de hidrogênio se formam, possibilitando um pareamento paulatino ao longo de toda a molécula. A primeira etapa é chamada de desnaturação do DNA e a segunda, de renaturação (Hausmann, 1997)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis é uma transposição *in vitro* do mecanismo de replicação do DNA celular (Saiki *et al*, 1985). São adicionados ao tubo de reação todos os componentes necessários para essa replicação: os nucleotídeos que compõem a cadeia do DNA (guanina, citosina, adenina e timina), os oligonucleotídeos que servirão de iniciadores (*primers*), uma enzima de amplificação (a polimerase) e uma solução tampão que fornecerá as condições de salinidade e pH ideais para que a reação ocorra. A amplificação do DNA alvo pode ser realizada procedendo-se à extração do DNA ou diretamente de materiais clínicos como os fluidos orgânicos e os tecidos (Townwer & Cockayne, 1993). A delimitação da região a ser amplificada, ou seja, a especificidade da técnica é dada pelos *primers* escolhidos. Estes são seqüências de nucleotídeos de fita simples, sintetizados comercialmente e complementares às extremidades da região que se quer amplificar.

A técnica de PCR depende fundamentalmente da enzima de amplificação, a DNA polimerase. Esta é responsável pelo processo de extensão do DNA. A polimerase utilizada inicialmente na técnica da PCR era extraída da bactéria *Escherichia coli*, entretanto, a grande susceptibilidade dessa enzima às altas temperaturas tornava o método economicamente dispendioso, já que a cada ciclo era necessário adicionar nova quantidade de enzima. A

descoberta de que bactérias que vivem em fontes naturais de águas quentes possuem uma enzima polimerase resistente às altas temperaturas foi um importante avanço técnico para a utilização da PCR. Atualmente, a DNA polimerase utilizada na PCR é proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (*Taq*polimerase), que é capaz de se manter estável a 94° C.

A PCR consiste na repetição de três passos básicos: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação consiste na incubação do material em estudo a altas temperaturas (94° C) com o objetivo de romper as pontes de hidrogênio e separar a fita dupla de DNA. O anelamento é o pareamento dos *primers* às suas seqüências complementares no genoma e se dá a partir do resfriamento da reação. A temperatura de anelamento varia de acordo com o *primer* utilizado, mas, geralmente, situa-se entre 45 e 65°C. Finalmente, a temperatura é novamente elevada, geralmente a 74°C, permitindo que a enzima polimerase inicie a síntese de novas cadeias, de acordo com a seqüência a ser copiada (extensão). Esses três passos são repetidos por 25 a 35 ciclos e a cada ciclo, o número de cópias do DNA cresce de maneira exponencial (fig 2). A reação completa se dá em cerca de duas horas. (Townwer & Cockayne, 1993).

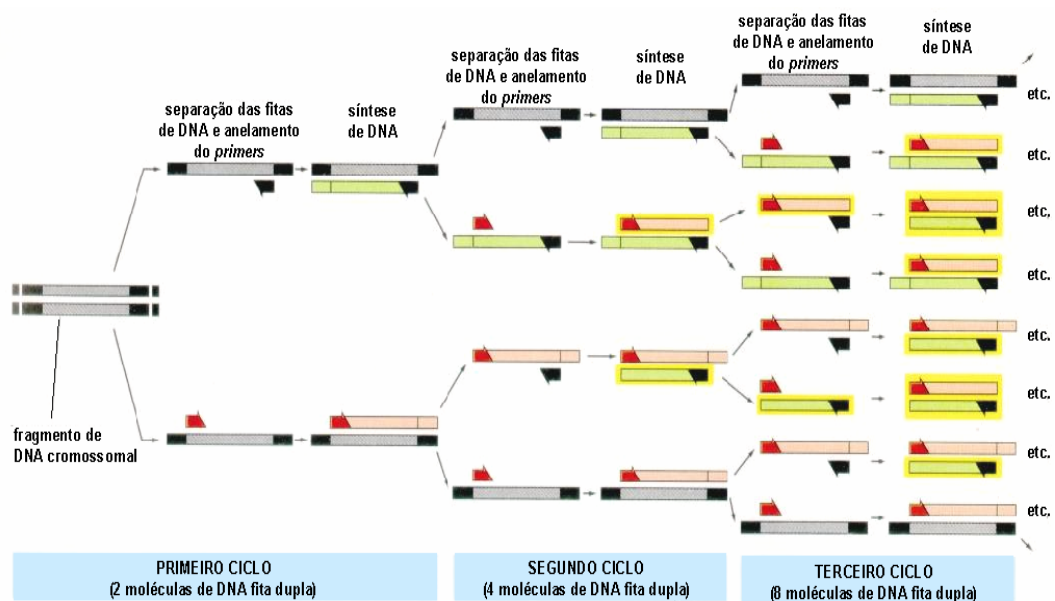
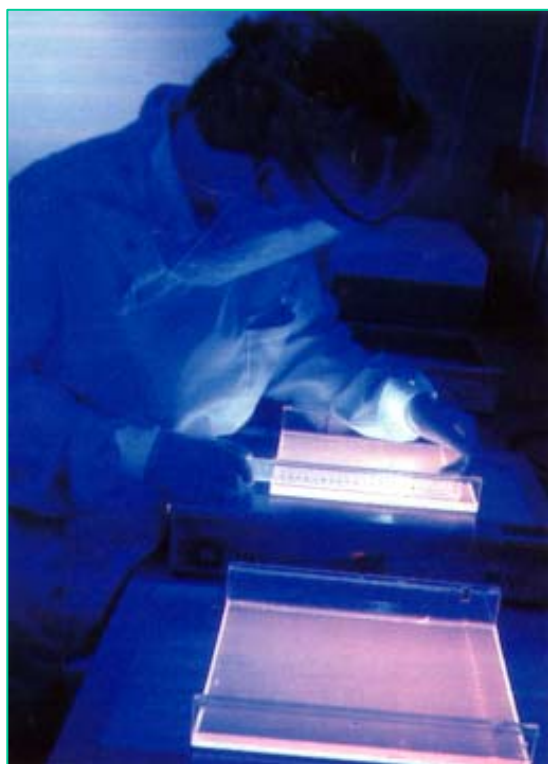


Fig.2: Reação em cadeia da polimerase

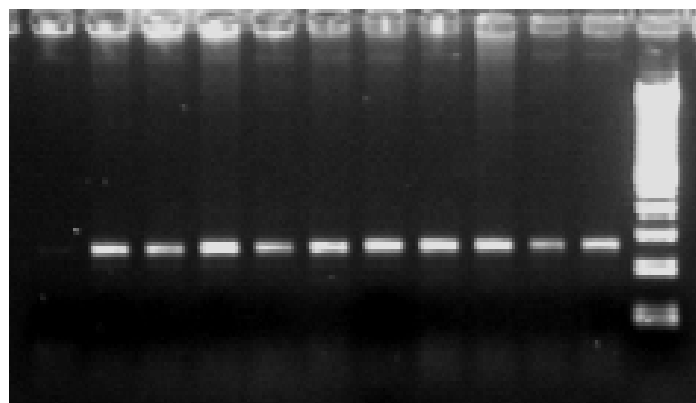
Fonte: Albert B *et al*, 1997

Desde que as condições da reação já estejam padronizadas, a execução da PCR é um procedimento relativamente de fácil execução. O tubo com os componentes da reação é colocado em um aparelho que controla automaticamente as mudanças de temperatura em cada ciclo (termociclador). No final do processo, o DNA produzido é observado, após eletroforese, em um gel de agarose ou poliacrilamida, habitualmente como uma banda única que corresponde ao tamanho da sequência amplificada. O tamanho do fragmento é determinado pela comparação com um marcador de peso molecular, que apresenta várias bandas de tamanhos conhecidos. O gel é visualizado sob luz ultravioleta após a coloração com brometo de etídio (fig 3).

Fig. 3: Eletroforese em gel de agarose



A



B

Fig 3: A = visualização do gel sob luz ultravioleta; B = visualização de fragmentos de DNA em relação a um marcador de peso molecular.

Fonte: Serviço de Genética Médica – Laboratório de Biologia Molecular

É importante sempre incluir um controle negativo em cada reação, que consiste em um tubo com todos os reagentes, exceto o DNA alvo. A visualização de uma banda no controle negativo invalida o teste e sugere contaminação. A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de detecção de quantidades muito pequenas de DNA. Teoricamente, apenas uma molécula de DNA proveniente de uma única célula poderia ser amplificada (Towner & Cockaine, 1993).

O diagnóstico molecular de microrganismos pela técnica da PCR pode ser feito por duas abordagens. A primeira é através do uso de *primers* específicos para o organismo que se pretende identificar. Esse método permite identificar diferentes microrganismos como, por exemplo, vírus e micobactérias (Greisen *et al*, 1994). A outra abordagem é o uso de *primers* inespecíficos, universais ou PCR *broad range*. A construção desses *primers* tem como princípio o conhecimento de que os genes que codificam as subunidades 23S, 16S e 5S do RNA ribossômico (rRNA) de todas as bactérias possuem regiões conservadas, de seqüência idêntica, intercaladas com regiões únicas de cada espécie bacteriana (Qian *et al*, 2001). A amplificação da região conservada, comum a virtualmente todas as bactérias, indica a presença de bactérias na amostra analisada (Harris & Hartley, 2003). Após detectada a presença de bactérias na amostra clínica estudada, sua identificação poderá ser feita através da técnica de seqüenciamento do fragmento do DNA amplificado (Rantakokko-Javala *et al*, 2001)

Alternativamente, pode-se usar *primers* específicos para algumas espécies, em um procedimento chamado PCR *nested*. O PCR *nested* usa dois pares de *primers*, em duas reações subseqüentes. O primeiro par amplifica a região conservada na amostra clínica e o segundo par amplifica a região específica. Essa técnica é útil para o diagnóstico de situações nas quais poucas espécies bacterianas estão envolvidas, como acontece nas infecções do sistema nervoso central (Cheski *et al*, 2002).

Algumas limitações inerentes ao método podem ser responsáveis tanto por resultados falso positivos quanto por resultados falso negativos. A amplificação do DNA (e do RNA) é um método altamente sensível e por isso sujeito a contaminação. As fontes prováveis de contaminação são as outras amostras, os produtos de amplificações prévias e a contaminação dos próprios reagentes utilizados durante o processamento da técnica (Vannechoutte & Van Eldery, 1997). A enzima *TaqDNA* polimerase, por exemplo tem uma alta afinidade pelo DNA e a contaminação da própria enzima com DNA específico é um fato bem conhecido em biologia molecular (Harris & Hatler, 2003). Vários recursos são utilizados visando “purificar”

os reagentes da PCR. O tratamento das amostras com irradiação ultravioleta é um dos mais utilizados. Outra estratégia é limitar o número de ciclos de amplificação (Harris & Hatler, 2003).

Os resultados falso-negativos estão relacionados à baixa sensibilidade intrínseca da técnica, a qual pode ser melhorada tanto por re-amplificação das amostras quanto pela utilização de técnicas de hibridização (Vannechoutte & Van Eldery, 1997). A presença de inibidores da polimerase em algumas amostras clínicas também pode ser responsável por resultados falso-negativos (Qian *et al*, 2001).

1.3.2 Aplicação clínica

As técnicas de biologia molecular têm sido cada vez mais utilizadas no diagnóstico de doenças infecciosas e têm recebido particular atenção por sua capacidade de detecção e identificação de microrganismos não cultiváveis, de microrganismos com crescimento extremamente lento e de microrganismos que exigem meios de cultura especializados (Rantakokko-Javala, 2000). A identificação do bacilo *Tropheryma whippelli* relacionado à doença de Whipple só foi possível através dessa técnica, a despeito de inúmeras tentativas de cultivo. (Relman *et al*, 1992)

Outra característica importante dos métodos moleculares é a sua potencial capacidade de detecção de organismos em baixas concentrações. São exemplos: a detecção do genoma do vírus HIV no sangue humano, o qual pode se apresentar em concentrações tão baixas quanto 1 genoma de HIV para 100.000 genomas humanos (Towner & Cockayne, 1993) e a identificação de patógenos em pacientes sob tratamento antibiótico (Kupila *et al*, 2003; Rantakokko-Javala *et al*, 2000).

Inicialmente, a maioria dos ensaios moleculares estava dirigida a organismos específicos. Isto conferia à técnica, altas sensibilidade e especificidade, entretanto exigia múltiplos ensaios de triagem. A utilização de *primers* universais tem possibilitado a detecção de um número considerável de espécies bacterianas em um único ensaio (Rantakokko-Javala *et al*, 2000). O gene que codifica a sub-unidade 16S do gene de rRNA vem sendo utilizado como método substituto ou complementar à cultura convencional.

Rantakokko-Javala *et al* (2000) compararam a técnica de amplificação dos genes 23S e 16S rRNA com a cultura convencional no diagnóstico de infecções bacterianas em 536 soros de pacientes hospitalizados e encontraram 83% de concordância entre ambos os testes. Em 2,4% dos casos, particularmente naqueles pacientes em uso de antibióticos, o diagnóstico só foi possível pelo método molecular. Na experiência destes autores, a PCR foi superior à cultura convencional.

No diagnóstico etiológico das infecções bacterianas do sistema nervoso central, a PCR tem demonstrado resultados promissores (Corless *et al*, 2001; Chesky *et al*, 2000). Em nosso meio, Failace (1999) avaliou o desempenho da PCR no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas. A autora utilizou um ensaio de PCR em duas etapas: na primeira, a amplificação foi feita com *primers* universais (subunidade 16S rRNA) e, na segunda, utilizou-se uma combinação de três *primers* para as espécies *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H.*

influenzae. A sensibilidade encontrada foi de 88,1%, a especificidade de 99,0%, o valor preditivo negativo de 90,1% e o valor preditivo positivo de 98,7%. A sensibilidade do método foi superior aos métodos laboratoriais habitualmente empregados para o diagnóstico de meningite bacteriana. Para a autora, em pacientes com essa situação ou na sua suspeita, os resultados da PCR estão fortemente associados ao diagnóstico final.

Recentemente, Kupila *et al* (2003) testaram o valor do uso da técnica de PCR com *primers* universais combinada ao seqüenciamento no diagnóstico de abscessos cerebrais e infecções do sistema nervoso central. Concluíram que, nessas situações, a PCR pode ser o único método de diagnóstico etiológico, especialmente em pacientes em uso de antibióticos.

Outras aplicações da técnica têm sido o diagnóstico de septicemia (Jordan *et al*, 2000), estados febris inespecíficos (McCabe *et al*, 1995), morte súbita (Nikkari *et al*, 2002), dentre outros.

Bosshard *et al* (2003) demonstraram que a detecção do DNA bacteriano em amostras de endocárdio é superior à hemocultura e à cultura de tecido no diagnóstico de endocardite infecciosa.

A técnica de PCR tem raramente, sido testada em líquido de ascite. Liou *et al* (1992) testou o primer específico para o vírus da hepatite C em amostras de sêmen, urina, saliva e ascite. O vírus foi detectado em todas as amostras de ascite, em 48% das amostras de saliva, 24% no sêmen e 7% na urina.

Such *et al* (2002) demonstraram a amplificação do gene 16S rRNA no fluido ascítico de nove adultos cirróticos assintomáticos, com cultura negativa e número de polimorfonucleares na ascite inferior a 250 células/ μ L.

2 JUSTIFICATIVA

A infecção da ascite é uma complicação séria que, não raramente, acomete pacientes com hepatopatia crônica. Acarreta altas morbidade e mortalidade, apresentando uma significativa taxa de recorrência. O diagnóstico é laboratorial e baseia-se na identificação de valores de polimorfonucleares superiores a 250 células/ μ L de ascite. Como o número de microrganismos presentes na ascite é muito pequeno, a cultura é frequentemente negativa.

O método de amplificação do DNA bacteriano com *primers* universais tem permitido a detecção de patógenos não demonstrados pelos métodos convencionais. Em situações semelhantes à infecção da ascite, como àquelas relacionadas ao sistema nervoso central, a técnica molecular tem se mostrado superior à cultura tradicional. Recentemente, Suchi *et al* (2002) demonstraram a presença de bactérias em ascites negativas pelos métodos diagnósticos habituais. Esses resultados suscitam a avaliação da técnica molecular no diagnóstico da infecção da ascite.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar a utilização do método de amplificação da subunidade 16S do gene rRNA no diagnóstico de infecção da ascite em crianças e adolescentes com hipertensão porta, acompanhados na unidade de gastroenterologia pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2 - Objetivos Específicos

- a) determinar a frequência de infecção do líquido de ascite em crianças e adolescentes com hipertensão porta pelos métodos convencionais: contagem de polimorfonucleares > 250 células/ μL e/ou positividade da cultura automatizada (BACTEC 9240);
- b) comparar a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivo positivo e negativo do método bacteriológico e da técnica de PCR no diagnóstico de PBE, utilizando como padrão áureo para o diagnóstico de infecção da ascite, o número de polimorfonucleares > 250 células/ μL de ascite.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados a seguir sob forma de dois artigos científicos que abrangem os objetivos listados anteriormente.

Infected and Noninfected Ascites in Pediatric Patients

Sandra MG Vieira, MD¹; Afonso L Barth PhD²; Carlos O Kieling, MD¹; Cristina T Ferreira, PhD¹; Adriano Taniguchi³; Ursula Matte, PhD¹; Themis R da Silveira, PhD⁴

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

² Associate Professor, Department of Analysis, UFRGS, Brazil.

³ Medical student, UFRGS, Brazil.

⁴ Associate Professor, Department of Pediatrics, UFRGS, Brazil.

Abstract

Objectives: To determine the prevalence of spontaneous bacterial peritonitis (SBP), bacterascites (BA) and noninfected ascites in pediatric patients with portal hypertensive ascites and to compare the clinical and laboratory features of infected and noninfected ascites.

Methods: Forty-one episodes of portal hypertensive ascites (serum-ascites albumin gradient \geq 1.1 g/dL) in 31 patients were studied. Median age was 2.9 years. Twenty-four (77.4%) patients were cirrhotic and 20 (83.3%) were classified as Child-Pugh C. Median PELD score was 18.5. The following ascites features were assessed: polymorphonuclear neutrophil cell count, cytology results, pH, levels of glucose, lactic dehydrogenase, total protein and albumin, Gram stain and bacteriological culture. Blood was sampled for blood count, coagulation, liver and kidney function tests. Groups were compared using the Mann-Whitney and chi-square tests ($p < 0.05$).

Results: Noninfected ascites were observed in 29/41 samples. SBP was observed in 8/41 and BA in 4/41. Fever, voluminous ascites and encephalopathy were the main symptoms of infected ascites. All patients with infected ascites and 62.0% of those with noninfected ascites were cirrhotic ($p = 0.01$). There was no statistical difference between patients with infected and noninfected ascites concerning Child-Pugh or PELD. Ascites culture was positive in 4/8 (50.0%) cases of SBP. Gram-negative rods were the most prevalent bacteria cultured. Except for serum albumin, no statistical differences were observed between patients with infected and noninfected ascites.

Conclusions: Ascites infection occurred in 12/41 pediatric patients with portal hypertension. Except by serum albumin, there were no differences between patients with infected ascites and noninfected ascites in terms of clinical and biochemical features.

Key words: spontaneous bacterial peritonitis in children, infected ascites, portal hypertension in children, ascites in children

Introduction

Children and adults with chronic liver disease often develop ascites late in the course of the disease in the presence of severe portal hypertension and hepatic insufficiency (1,2). Infection of the ascitic fluid is a potentially life-threatening complication among these patients which may be aggravated by septic shock, encephalopathy and progressive renal failure (3,4). The clinical presentation of ascitic fluid infection can be subtle or even asymptomatic (3,5,6), but prognosis is extremely poor (2,3,5,7).

In the absence of focal or surgical inflammatory process and depending on the results of ascitic fluid culture and polymorphonuclear neutrophil (PMN) cell count, bacterial infection of ascitic fluid may be classified as spontaneous bacterial peritonitis (SBP), culture-negative SBP (CN-SPB) or bacterascites (BA).

The incidence of SBP is 10.0-30.0% in hospitalized adult patients with cirrhosis (8-11) and the long-term prognosis of SBP is correlated with a high mortality rate (7,12). However, the prevalence and outcome of SBP in pediatric patients with chronic liver disease and ascites has been rarely described. In 1985, Larcher *et al* suggested that the incidence as well as the clinical features of SBP are similar in children and adults (13).

The aims of the present study were to determine the prevalence of SBP, BA and noninfected ascites in a group of pediatric patients with portal hypertension and to compare the clinical and laboratory features of infected and noninfected ascites in this group of patients.

Patients and Methods

Patients

From March 1995 to June 2002, 31 pediatric patients with portal hypertension and ascites were studied. All patients were attending the pediatric gastroenterology unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, a teaching hospital. None of the patients fulfilled the criteria for secondary peritonitis (5).

A serum to ascites albumin gradient ≥ 1.1 g/dL sampled simultaneously was used for the diagnosis of portal hypertensive ascites (14,15). In the same patient, an interval of one week was considered as a new episode of ascites.

The median age of patients was 2.9 years (interquartílico range: 0.8 – 8.5). Sixteen (51.6%) patients were males. Cirrhosis was present in 24 patients (11 cases of biliary atresia, 4 cases of cryptogenic cirrhosis, 2 cases of Budd-Chiari syndrome, 2 cases of biliary cirrhosis, 2 cases of autoimmune hepatitis type 1, 2 cases of galactosemia and 1 case of cystic fibrosis). Four patients (16.7%) were classified as Child-Pugh B and 20 (83.3%) as Child-Pugh C (Table 1). Other causes of portal hypertension were: congenital hepatic fibrosis in two patients and venoocclusive disease, Budd-Chiari syndrome without cirrhosis, hepatoblastoma, idiopathic chronic liver disease and mucopolysaccharidosis type VII, each affecting one patient.

The diagnosis of cirrhosis was based on clinical, biochemical, ultrasonographic and endoscopic findings and/or histology. Cryptogenic cirrhosis was diagnosed based on the absence of alpha-1 antitrypsin deficiency, inborn errors of metabolism, autoimmune hepatitis, sclerosing cholangitis, viral hepatitis B and C, congenital infectious disease, use of hepatotoxic drugs and Wilson disease. Exclusion criteria were antibiotic treatment for seven days before hospitalization and refusal to sign the informed consent form. We do not excluded patients in use of diuretic treatment.

The following signs and symptoms were assessed at the time of enrollment: presence of fever (axillar temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$), abdominal pain, rebound tenderness, alterations in gastrointestinal motility (vomiting, diarrhea, ileus), voluminous ascites (larger or gross ascites with marked abdominal distension), hepatic encephalopathy (clinical criteria and/or electroencephalogram), impairment of liver function (increased bilirubin, aminotransferase, decreased albumin and/or international normalized ratio of prothrombin time (INR), upper gastrointestinal bleeding, or renal failure (increased creatinine and/or urea).

Methods

All patients were submitted to a full blood count, coagulation tests (platelets, INR) and routine liver and kidney biochemistry tests (total and conjugated serum bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamiltransferase, serum albumin, creatinine and urea), and blood culture. The severity of the underlying liver disease was assessed according to the Child-Pugh classification (16) and PELD score (17).

Paracentesis, under standard aseptic conditions, was performed in all the patients selected. Ten patients were submitted to more than one paracentesis. Thus, a total of 31 patients and 41 paracentesis were studied. Ten mL of ascitic fluid were cultured at bedside in a blood culture flask incubated using the BACTEC 9240 system. Another fraction of the

ascitic fluid was used for Gram staining, for total and differential cell counts, for measurements of total protein, albumin, pH, glucose, cholesterol, for determination of lactic dehydrogenase, amylase and adenosine deaminase activity, and for cytology.

The study was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Definitions

Ascitic fluid was considered as noninfected when PMN count was ≤ 250 cells/ μL in the presence of negative aerobic and anaerobic cultures.

SBP has been defined as ascitic fluid infection with positive culture and PMN count > 250 cells/ μL (5). Until recently, the term CN-SBP or neutrocytic ascites had been used for ascites with PMN > 250 cells/ μL and negative culture (5); currently, however, the International Ascites Club recommends that patients with CN-SBP be included in the SBP group (5). BA is diagnosed in the presence of a positive and ascitic fluid PMN count ≤ 250 cells/ μL (5).

The diagnosis of SBP, CN-SBP and BA was established according to the standard criteria recommended by the International Ascites Club (5).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 10.0 (Chicago, USA). The baseline characteristics of the patients are presented as median and interquartil range. For continuous variables with non-Gaussian distribution, Mann Whitney's U test was used. To assess the association among categorical variables, the chi-square test was used. A *p* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

There were 12 episodes of infected ascites and 29 episodes of noninfected ascites (Table 1). PELD score median was 18.5 (interquartil range: 10.0 - 27.5). From 24 patients with cirrhosis, 20 were classified as Child-Pugh C. Ten cirrhotic patients had infected ascites (Table 1). Seven of these patients were classified as Child-Pugh C, and 3 were classified as Child-Pugh B.

Noninfected ascites were identified in 14 cirrhotic patients (20 episodes) and seven non-cirrhotic (9 episodes) patients (Table 1). Thirteen of these patients were classified as Child-Pugh C, and 1 were classified as Child-Pugh B.

Among 41 paracenteses, PMN count was > 250 cells/ μL in 8 cases, resulting in a prevalence of 19.5% for SBP. Ascitic fluid culture was positive in 4/8 cases of SBP; gram-negative bacteria was identified in three of these cases (*E.coli*: 2 and *K. pneumoniae*: 1). *S. aureus* was the only gram-positive isolate obtained in one case (Table 1).

In addition, BA was diagnosed in four samples of ascitic fluid. Thus, the prevalence of BA was 9.7%. The bacteria isolated from the ascitic fluid of patients diagnosed with BA included: *E.coli*, *Salmonella* sp, *S. pneumoniae* and a Gram-positive rod (Table 1). No bacteria were observed on Gram staining in any of the 41 paracentesis samples. No growth of anaerobic bacteria was observed.

There was no difference between patients with infected ascites and noninfected ascites in terms of symptoms. The most prevalent signs and symptoms observed included fever, voluminous ascites and hepatic encephalopathy. There was a statistically significant difference between infected and noninfected patients concerning presence of cirrhosis ($p=0.01$), but no difference was observed in terms of Child-Pugh classification ($p=0.50$ and $p=0.07$, for Child-Pugh B and Child-Pugh C, respectively) or PELD score ($p=0.71$) (Table 2).

Cytology results and the activity of amylase and adenosine deaminase were normal in all patients. Blood culture was positive in only 2 out of 34 cases. Both were classified as noninfected ascites. The organisms cultured were *S. aureus* and *Enterobacter* sp, one of each.

Patients with infected ascites had lower serum albumin concentration ($p=0.01$) and higher PMN count ($p=0.001$) than patients with noninfected ascites. The two groups did not differ with respect to white blood cells, neutrophil blood count, liver and kidney function tests, serum to albumin ascites gradient, biochemical ascitic fluid features, liver function tests and kidney function tests (Table 2).

Discussion

Since the first description of SBP by Kerr *et al* in 1963 (18), and by Conn and Fessel in 1964 (19), the clinical presentation, treatment and prognosis of this disease have been well established. However, other aspects are still subject to investigation, such as pathogenesis (20), diagnosis (21) and prevention (22).

Although most episodes of SBP develop in patients with advanced cirrhosis, this complication has also been observed in situations which are not associated with cirrhosis,

such as fulminant hepatic failure (23), nephrotic syndrome (24) and congestive heart failure (25). So far, most studies regarding SBP have been performed in adult patients with cirrhosis or experimental animals. The lack of reports focusing on pediatric patients is remarkable.

In this study, we reported the prevalence of SBP and BA in a group of 31 pediatric patients with portal hypertensive ascites with and without cirrhosis who presented 41 episodes of ascites. All the patients included in our study were hospitalized. Under these conditions, the prevalence of SBP, BA and noninfected ascites was 19.5%, 9.7% and 70.7% respectively. The prevalence of SBP and BA in this study was similar to that reported for adults with chronic liver disease (3,5,26,27). In children, a similar prevalence (17.5%) was also reported by Larcher *et al* (13). The prevalence of BA is unknown in pediatric patients. In adults, the prevalence of BA range to 1.0% to 10.4% (26).

According to The International Ascites Club Consensus Statement, the diagnosis of SBP is based on a PMN count > 250 cells/ μ L (5). Ascitic fluid culture is negative in 40.0 to 50.0% of the patients who fulfill criteria of SBP (3,5). Culturing ascitic fluid at bedside increases the sensitivity of the method in approximately 90.0% (28). Eight out of 41 ascitic fluid samples in this study had a PMN count > 250 cells/ μ L, and bacteriological culture was positive in 4/8 samples (50.0%). This is in accordance with previous reports (3, 5-7).

E. coli (2/4) and *K. pneumoniae* (1/4) were responsible for most SBP episodes, as also seen in adult patients. The most prevalent organism cultured in the pediatric series of Larcher *et al.* (13) was *S. pneumoniae* (80.0%), followed by *K. pneumoniae* (16.6%). Three (25.0%) of the patients in that study had reduced opsonizing capacity for pneumococci in sera (13). This immunodeficiency is attributed to advanced chronic liver disease (13). A predominance of gram-positive bacteria was also observed by Evans *et al.* (6) and Fernández *et al.* (29) in adults.

BA was identified in 4/41 (9.7%) episodes of ascites. The bacteria cultured were *Salmonella* sp, *S. pneumoniae*, *E. coli* and a non-identified gram-positive rod. This spectrum of bacteria is similar to that observed in SBP patients. Similarity between the organisms cultured from patients with BA and SBP has also been observed by Chu *et al.* (26). BA represents the transitory passage of bacteria through the ascitic fluid before lysis resulting from the bactericidal activity of ascites (3,5) but the clinical evolution of patients with untreated BA is not uniform (3,5,6). One of our patients developed SBP 24 hours after the diagnosis of BA.

In this study, Gram staining was not useful to identify SBP or BA. As stated in the literature, Gram staining of ascites obtained from SBP or BA is usually negative. In ascitic fluid samples with a small amount of bacteria, this technique has low sensitivity (3).

Clinical signs and symptoms such as fever and abdominal pain are considered the most prevalent features of SBP (5, 13). The prevalence of asymptomatic infection is variable; in adults, it has been reported to range from 18.0% (30) to 3.5% (6).

Fever, voluminous ascites and encephalopathy were the most prevalent clinical features in our patients with infected ascites. We had no cases of abdominal pain. Our patients with and without infection were similar in terms of the several symptoms and/or signs suggestive of infection. This finding supports the recommendation of the Ascites Club, which establishes that SBP cannot be diagnosed based solely on the presence of clinical symptoms and signs (5).

The comparison between our patients with and without infected ascites demonstrated a significant difference with respect to presence or absence of cirrhosis ($p < 0.01$). Infected ascites occurred in cirrhotic patients only. Serum albumin was lower in patients with infected ascites ($p = 0.01$). This might suggest that hepatic dysfunction could have an important role in the development of ascitic infection. Several factors associated with end-stage liver disease – such as immunodeficiency, increased permeability of the intestinal mucosal barrier and intestinal bacterial overgrowth – may explain the predisposition of cirrhotic patients to infections (31, 32). Still, there is no consensus concerning the role played by the severity of liver disease in the development of SBP (30, 33).

Two scores were used in this study to evaluate the severity of liver disease: Child-Pugh and PELD. We did not observe any difference between patients presenting infected and noninfected ascites in terms of Child-Pugh classification (stage B: $p = 0.5$; stage C: $p = 0.07$) or PELD score ($p = 0.71$). In addition, no difference was observed between these two groups in terms of other parameters used to assess liver function. These results are similar to those recently published by Thanopoulou *et al* in hospitalized adult patients (30) and to those of Evans *et al.*, who did not find a statistical difference in liver function tests when comparing outpatients with and without SBP (6).

The biochemical features of ascites in the groups presenting infected and noninfected ascites were similar. These results support the consensus position that these features can only distinguish patients with secondary peritonitis (5).

The low concentration of total protein (< 1.0 g/dL) in ascites is a known predisposing factor for the development of SBP (3,33). It is related to the low ascitic fluid bactericidal

capacity observed in cirrhotic patients (3). However, we did not observe a decreased level of total protein concentration in the ascitic fluid of patients with infected ascites. This could be explained by the fact that some of our patients were using diuretic drugs which increase the concentration of total proteins in ascitic fluid (3). Still, our results are not different from those of a previous study in which treatment with diuretic drugs was interrupted at the time of diagnosis of SBP (30). In fact, there is no consensus in the literature about the role of ascitic fluid total protein levels in predicting the development of SBP (34, 35).

Some limitations of this study should be addressed. Our patients were recruited from a tertiary referral center which limits the applicability of our results. The number of infected and noninfected samples was different (12 infected and 29 noninfected samples). In addition, it could be that we were unable to detect some differences because of the small number of infected samples analyzed. When comparing the groups with and without infected ascites, effect size was calculated using logarithmic transformation of asymmetric variables. Effect sizes > 0.06 are considered to be moderate, and suggest that a statistical difference was not detected due to the small sample size. In this study, effect size ranged from 0.01 to 0.07 (data not shown). Since the value of 0.07 was related to serum albumin, we believe that a larger sample would not have had an impact on the significance of our results.

The prevalence of SBP and BA in pediatric patients with portal hypertensive ascites and cirrhosis seems to be the same as in adult patients. Ascites culture was positive in only 50.0% of ascites with PMN count > 250 cells/ μ L, confirming the low sensitivity of this method to identify SBP.

Except for the presence of cirrhosis and for a lower concentration of serum albumin, pediatric patients with infected ascites were not different from patients with noninfected ascites with respect to clinical presentation, severity of liver disease estimated by Child-Pugh and PELD score, standard liver function tests, renal function and biochemical features of ascites. No clinical signs or symptoms were useful to distinguish patients with infected ascites from those with noninfected ascites. This underscores the important role of paracentesis in evaluating patients with ascites and portal hypertension.

References

1. Arroyo V, Colmenero J. Ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathophysiological basis of therapy and current management. *J Hepatol* 2003; 38:S69–89.
2. McDiarmid SV. Treatment of end-stage liver disease. In: Walker S, Durie P, Hamilton JR, et al., eds. *Pediatric gastrointestinal disease*. Lewiston: BC Decker; 2000:1250–71.
3. Such J, Guarner C, Runyon B. Spontaneous bacterial peritonitis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, et al., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden: Blackwell Science; 1999:99–113.
4. Perdomo Coral G, Alves de Mattos A. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis: incidence and prognosis. *Can J Gastroenterol* 2003;17:187–90.
5. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, et al. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *J Hepatol* 2000; 32:142–53.
6. Evans LT, Ray Kim W, Poterucha JJ, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003;37:897–901.
7. França AVC, De Souza JB, Silva CM, et al. Long-term prognosis of cirrhosis after spontaneous bacterial peritonitis treated with ceftriaxone. *J Clin Gastroenterol* 2001; 33:295–8.
8. Almdal TP, Skinhoj P. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. Incidence, diagnosis, and prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22:295–300.
9. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18:353–8.
10. Bac D-J, Siersema PD, Mulder PGH, et al. Spontaneous bacterial peritonitis: outcome and predictive factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993;5:635–40.
11. Toledo C, Salmerón JM, Rimola A, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993; 17:251–7.
12. Llovet JM, Planas R, Morillas R, et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:388–92.
13. Larcher VF, Manolaki N, Vegnent A, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in children with chronic liver disease: clinical features and etiologic factors. *J Pediatr* 1985; 106:907–12.

14. Dittrich S, Yordi LM, Mattos AA. The value of serum-ascites albumin gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites. *Hepatology* 2001; 48:166–8.
15. Hoefs J. Characteristics of ascites. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, et al., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden: Blackwell Science; 1999:25–41.
16. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus in bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60:648–52.
17. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, et al. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Transplant* 2001; 7:567–80.
18. Kerr DNS, Pearson DT, Read AE. Infection of ascitic fluid in patients with hepatic cirrhosis. *Gut* 1963; 4:394–8.
19. Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients caused by enteric bacteria. *Ann Intern Med* 1964; 60:568–80.
20. Chiva M, Guarner C, Peralta C, et al. Intestinal mucosa oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:145–50.
21. Castellote J, López C, Gornals, et al. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 2003; 37:893–6.
22. Bauer TM, Follo A, Navasa M. Daily norfloxacin is more effective than weekly rifloxacin in prevention of spontaneous bacterial peritonitis recurrence. *Dig Dis Sci* 2002; 47:1356–61.
23. Radha K, Dhiman RK, Makharia GK, et al. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis in fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2126–8.
24. Hingorani SR, Weiss NS, Watkins SL. Predictors of peritonitis in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2002; 17:678–82.
25. Shaked Y, Samra Y. Primary pneumococcal peritonitis in patients with cardiac as report of 2 cases. *Cardiology* 1988; 75:372–4.
26. Chu C-M, Chang K-Y, Liaw Y-F. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. *Dig Dis Sci* 1995; 40:561–5.
27. Runnyon BA. Monomicrobial non-neutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1990; 12:710–5.
28. Runnyon BA, Canawati HN, Akriadias EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988; 95:1351–5.

29. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35:140–8.
30. Thanopoulou AC, Koskinas JS, Hadziyannis SJ. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002; 33:194–8.
31. Rimola A, Solo R, Bory F, et al. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984;4:53–8.
32. Solá R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351–4.
33. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, et al. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic with ascites. *Gastroenterology* 1993; 104:1133-8.
34. Llach J, Rimola A, Navasa M, et al. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein. *Hepatology* 1992; 16:724-7.
35. Hurwich DB, Lindor KD, Hay JE, et al. Prevalence of peritonitis and the ascitic fluid protein concentration among chronic liver disease patients. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:1254–7.

Table 1. Clinical, laboratory results and classification of ascites in 31 patients with portal hypertension

Patient/ Paracentesis	Age (years)	Gender	Etiology of portal hypertension	Child-Pugh	PMN** (ascites)	Culture (ascites)	PELD*** Score	Ascites Classification
1								
Paracentesis 1					34	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	2.9	F	Congenital hepatic fibrosis	N-C*	4	Negative	3.0	Noninfected
2								
Paracentesis 1	13.0	F	Cryptogenic cirrhosis	C	9380	<i>E. coli</i>	20.0	SBP*****
3								
Paracentesis 1	0.6	M	Cryptogenic cirrhosis	C	208	Negative	45.0	Noninfected
4								
Paracentesis 1	19.0	M	Biliary cirrhosis	C	90	Negative	17.0	Noninfected
5								
Paracentesis 1	9.6	M	Budd-Chiari syndrome	N-C	6	Negative	4.0	Noninfected
6								
Paracentesis 1					10	Negative	1.0	Noninfected
Paracentesis 2	9.3	F	Cystic fibrosis	C	138	Negative		Noninfected

7								
Paracentesis 1					720	Negative		SBP
Paracentesis 2	1.3	M	Biliary atresia	C	1400	<i>E. coli</i>	17.0	SBP
8								
Paracentesis 1	6.0	F	Budd-Chiari syndrome	B	2	Negative	-0.6	Noninfected
9								
Paracentesis 1	0.5	M	Biliary atresia	C	8	Negative	26.0	Noninfected
10								
Paracentesis 1	20.2	M	Cryptogenic cirrhosis	B	624	Negative	22.0	SBP
11								
Paracentesis 1					6	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	13.9	F	Autoimmune hepatitis type 1	C	560	<i>K. pneumoniae</i>	10	SBP
12								
Paracentesis 1					2	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	3.6	M	Congenital hepatic fibrosis	N-C	8	Negative	8.0	Noninfected
13								
Paracentesis 1	0.8	M	Biliary atresia	C	90	Negative	54.0	Noninfected

14								
Paracentesis 1					30	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	0.9	F	Biliary atresia	C	9	Negative	18.0	Noninfected
15								
Paracentesis 1	0.6	M	Galactosemia	C	4	Negative	20.0	Noninfected
16								
Paracentesis 1	1.0	M	Venocclusive disease	N-C	18	Negative	11.0	Noninfected
17								
			Idiopathic chronic liver			Negative		
Paracentesis 1	0.2	M	disease	N-C	3		21.0	Noninfected
18								
Paracentesis 1	11.3	F	Autoimmune hepatitis type 1	B	6.5	<i>Salmonella</i> sp	9.0	Bacterascites
19								
Paracentesis 1					120	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	4.5	F	Hepatoblastoma	N-C	27	Negative	7.0	Noninfected
20								
Paracentesis 1					162	<i>S. pneumomiae</i>		Bacterascites
Paracentesis 2	2.9	M	Budd-Chiari syndrome	B	217	Negative	15.8	Noninfected

21									
Paracentesis 1					258	Negative		SBP	
Paracentesis 2	12.0	M	Biliary atresia	C	72	<i>E.coli</i>	28.0	Bacterascites	
22									
Paracentesis 1	6.9	F	Cryptogenic cirrhosis	C	0	Negative	21.0	Noninfected	
23									
Paracentesis 1	11.9	F	Biliary cirrhosis	C	6	Negative	36.0	Noninfected	
24									
Paracentesis 1	0.9	F	Biliary atresia	C	255	Negative	17.0	SBP	
25									
Paracentesis 1	0.9	F	Biliary atresia	C	300	<i>S. aureus</i>	10.0	SBP	
26									
Paracentesis 1	1.6	F	Biliary atresia	C	4	Negative	28.0	Noninfected	
27									
Paracentesis 1	0.9	M	Biliary atresia	C	4	Negative	10.0	Noninfected	
28									
3	Paracent	2.9	F	Biliary atresia	C	1	Negative	13.0	Noninfected

esis 1

29

Paracentesis 1					9	Negative		Noninfected
Paracentesis 2	0.8	F	Biliary atresia	C	66	Negative	30.0	Noninfected

30

Paracentesis 1	0.3	M	Mucopolysaccharidosis VII	N-C	99	Negative	23.0	Noninfected
----------------	-----	---	---------------------------	-----	----	----------	------	-------------

31

Paracentesis 1					10	Gram positive		Bacterascite
	0.5	M	Galactosemia	C		rod	23.0	

* N-C = non-cirrhosis;; **PMN = polymorphonuclear neutrophil; ***PELD= pediatric end-stage liver disease; ****SBP = spontaneous

bacterial peritonitis

Table 2. Laboratory tests and PELD score in 31 patients with and without infected ascites.

Clinical and laboratory data	Infected Ascites	Noninfected Ascites	p
	(PMN* \geq 250 cells/ μ L and/or positive culture)	(PMN* < 250 cells/ μ L and/or negative culture)	
	n = 12	n = 29	
	Median (p25-p75)	Median (p25-p75)	
PELD	18.5 (11.8-22.0)	18.5 (10.0-27.5)	0.71
White blood cells	11800.0 (6275.0-15450.0)	7470.0 (5650.0-11250.0)	0.22
PMN* (blood)	8652.0 (3316.0-12070.0)	5184.0 (3144.0-6398.0)	0.15
Albumin (serum)	2.3 (1.8-2.5)	2.9 (2.0-3.7)	0.01
Aspartate aminotransferase (serum)	117.0 (48.2-140.2)	104.0 (57.0-174.5)	0.89
Alanine aminotransferase (serum)	67.0 (35.2-146.5)	45.0 (24.0-95.0)	0.33
Total bilirubin (serum)	10.2 (1.8-16.6)	5.4 (1.5-18.9)	0.76
Conjugated bilirubin (serum)	7.4 (0.9-11.5)	3.0 (0.6-7.7)	0.34
Non-conjugated bilirubin (serum)	3.1 (0.9-6.9)	2.3 (0.9-9.4)	0.87
INR**	1.3 (1.2-1.9)	1.5 (1.2-1.9)	0.83
Creatinine (serum)	0.5 (0.4-0.7)	0.5 (0.3-0.6)	0.34
Urea (serum)	26.5 (17.3-34.3)	21.0 (13.0-35.0)	0.41
Serum-ascites gradient	1.7 (1.5-2.1)	2.1 (1.7-2.4)	0.05
PMN* (ascites)	279.0 (94.5-696.0)	9.0 (4.0-78.0)	0.001
pH (ascites)	7.4 (7.3-7.5)	7.4 (7.3-7.5)	0.76
Glucose (ascites)	88.5 (67.5-103.0)	104.0 (88.0-113.0)	0.07
Albumin (ascites)	0.3 (0.2-0.5)	0.4 (0.2-1.5)	0.30
Total protein (ascites)	0.7 (0.5-1.6)	1.0 (0.5-2.4)	0.47
LDH*** (ascites)	100.5 (49.7-117.3)	94.0 (72.5-167.0)	0.68

*PMN = polymorphonuclear neutrophil ; **INR = international normalized ratio; ***LDH = lactic dehydrogenase; PELD= pediatric end-stage liver disease

Amplification of bacterial 16S rRNA gene is more sensitive than BACTEC culture to diagnose spontaneous bacterial peritonitis

Sandra M. G. Vieira, MD¹; Ursula Matte, PhD¹; Afonso L. Barth, PhD²; Carlos O. Kieling, MD¹; Hugo Pena Costa⁴; Daniela Correia⁴; Cristina T. Ferreira, PhD¹; Adriano Taniguchi³; Themis R. da Silveira, PhD⁵

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

² Associate Professor, Department of Analysis, UFRGS, Brazil.

³ School of Medicine, UFRGS, Brazil.

⁴ School of Biochemistry, Technical University of Lisboa, Portugal

⁵ Associate Professor, Department of Pediatrics, UFRGS, Brazil.

Abstract

In the absence of focal or surgical inflammatory process there are two forms of infected ascites: spontaneous bacterial peritonitis (SBP), diagnosed in the presence of a polymorphonuclear (PMN) cell count $> 250/\mu\text{L}$, and bacterascites (BA), diagnosed in the presence of a positive ascites culture with a PMN cell count $\leq 250/\mu\text{L}$. Ascitic infection, especially SBP, is associated with great morbidity and mortality, requiring prompt diagnosis and treatment. The aim of this paper was to compare 16S rRNA gene amplification with the BACTEC culture system to diagnose infected ascites. Thirty-one patients and 40 ascitic fluid samples were studied. There were 12 episodes of infected ascites (8 SBP and 4 BA). Culture was positive in 4/8 cases of SBP. Bacterial DNA amplification was positive in 7/8 cases of SBP. To diagnose SBP, the sensitivity of BACTEC was 50%; specificity was 85.7%; and negative predictive value (NPV) was 85.7%. The sensitivity of bacterial DNA amplification was 87.5%; specificity was 65.6%; and NPV was 95.5%. In addition, bacterial DNA amplification was positive in 3/4 cases of BA and 8/28 cases of culture-negative nonneutrocytic ascites (CNNNA). Patients with CNNNA and positive bacterial DNA were not different from patients with CNNNA and negative results on bacterial DNA amplification with respect to PELD score, serum to albumin ascites gradient and mortality in three months. In conclusion, 16S rRNA gene amplification was more sensitive than the BACTEC culture system to diagnose SBP. However, bacterial DNA amplification does not seem to allow a distinction between patients with bacterial ascites infection and those with ascitic fluid colonization.

Introduction

Ascitic infection is a frequent complication in patients with chronic liver disease, especially during advanced stages. This infection seems to result from several mechanisms associated with portal hypertension and liver dysfunction (1-3). It is not known how intestinal bacteria reach the ascitic fluid; this phenomenon has been attributed to the translocation of viable bacteria from mesenteric lymph nodes to blood and then to ascitic fluid (2,4). Ascitic infection is associated with great morbidity and mortality (5,6), thus requiring prompt diagnosis and treatment.

Two types of ascitic infection are identified in the absence of focal or surgical inflammatory processes: bacterascites (BA) and spontaneous bacterial peritonitis (SBP). The former usually signifies bacterial colonization and is diagnosed in the presence of a positive ascites culture without inflammatory peritoneal response (7). On the other hand, because the culture of ascites is often negative, the key to diagnose SBP is a polymorphonuclear (PMN) cell count > 250 cells/ μ L in ascitic fluid (7). The low positivity of bacterial culture in ascites samples is possibly due to the relatively small concentration of bacteria in ascitic fluid, such as occurs in cerebrospinal fluid (7,8). Runyon et al. have demonstrated that inoculation of ascites directly into blood culture bottles at the bedside increases the sensitivity of bacterial culture to 90% (9). However, in general practice, ascites culture is negative in about 40% of patients with SBP (10-12).

Polymerase chain reaction (PCR), originally described by Mullis et al., is based on the enzymatic amplification of a specific sequence of DNA with production of millions of copies (13); thus, this technique has the potential for sensitivity (14-16). The use of universal PCR primers targeting conserved DNA regions in bacteria, such as 16S ribosomal RNA (rRNA) sequences, is a promising means for identifying bacteria in clinical samples (16-20). The main potential applications of PCR include the detection of microorganisms not identified by conventional methods, such as slow growing bacteria and fastidious bacterial pathogens, as well as the detection of bacteria in low concentrations (14,15,21).

To our knowledge, only one study so far (22) has focused on the amplification of 16S rRNA to investigate the presence of bacteria in ascitic fluid. The authors found bacterial DNA in 9 out of 28 asymptomatic patients with culture-negative, nonneutrocytic ascites (CNNNA). Therefore, the aim of the present study was to

compare the efficacy of 16S rRNA gene amplification and of the BACTEC culture system to diagnose infected ascites in pediatric patients with portal hypertensive ascites.

Patients and Methods

Patients

From March 1995 to June 2002, 31 patients with portal hypertensive ascites were enrolled in the study. All patients were attending the pediatric gastroenterology clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, a university hospital. A serum to ascites albumin gradient ≥ 1.1 g/dL (blood and ascitic fluid sampled simultaneously) was used to diagnose portal hypertensive ascites.

The diagnosis of cirrhosis was based on clinical, biochemical, ultrasonographic and/or histologic criteria. Cryptogenic cirrhosis was diagnosed when the following causes were ruled out: alpha-1-antitrypsin deficiency, inborn errors of metabolism, sclerosing cholangitis, viral hepatitis B and C, congenital infective disease, use of hepatotoxic drugs, presence of autoantibodies to autoimmune hepatitis types 1 and 2, and Wilson Disease. The severity of the underlying liver disease was assessed using the Pediatric End-Stage Liver Disease (PELD) score (23).

Exclusion criteria were intake of antibiotics in the week before the paracentesis procedure and refusal to sign the informed consent form. Patients using diuretic drugs were not excluded from the study. Blood was obtained for bacterial culture and for investigation of total and unconjugated bilirubin, serum albumin, prothrombin time international normalized ratio and activated thromboplastin time.

The median age of patients was 2.9 years (interquartile range: 0.8-8.5). Sixteen patients were males. Cirrhosis of several etiologies was present in 24 patients. Causes of portal hypertension not related to cirrhosis were venoocclusive disease, hepatoblastoma, Budd-Chiari syndrome, mucopolysaccharidosis VII and hepatic congenital fibrosis. The clinical and laboratory features of the patients are described in Table 1. Median PELD score was 18.5 (interquartile range: 10.0-27.5).

Methods

Ascites samples and bacterial culture

Paracentesis was performed in all patients under standard aseptic conditions. Nine patients were submitted to more than one paracentesis procedure, resulting in 40 ascites

samples. Paracentesis procedures performed 48 hours after diagnosis of SBP or BA were not included in the analysis.

Ascitic fluid (10 mL) was submitted to the following analyses: Gram stain; aerobic and anaerobic cultures; total and differential cell count; determination of total protein and albumin concentrations, pH, glucose and cholesterol levels; determination of lactic acid dehydrogenase activity; cytology; and determination of amylase and adenosine deaminase levels. Simultaneously, 10 to 30 mL of ascitic fluid were stored at -20° C for posterior bacterial DNA detection.

Bacterial aerobic and anaerobic cultures were performed by bedside inoculation of 10 mL of ascitic fluid into culture bottles and incubation in the BACTEC 9240 culture system. Diagnosis of SBP was based on a PMN cell count > 250 cells/ μ L (7). BA was identified in the presence of a positive culture and PMN cell count \leq 250 cells/ μ L (7). CNNNA was identified in the presence of a negative culture and PMN cell count \leq 250 cells/ μ L.

Detection of Bacterial DNA

Frozen ascitic fluid was analyzed seven to one year after collection. After defrosting at room temperature, 10 mL of ascitic fluid were centrifuged at 2,000 rpm for 20 minutes and 9 mL of supernatant were removed. The pellet was mixed by vortexing and a volume of 0.5 mL was used for DNA extraction. The remaining fluid was kept frozen for further analysis. DNA extraction was performed using TRIZOL™ according to the manufacturer's instructions.

Bacterial DNA was detected using 16S rRNA gene primers as described by Such et al. (22). Briefly, 2 μ L of DNA were mixed to 1X KCl Buffer, 0.2mM of dNTP mix, 1.5 mM of MgCl₂, 0.5 U of Taq DNA polymerase and 40 pmol of each primer, for a total volume of 50 μ L. All reagents were obtained from Invitrogen. The reaction was performed in an MJ Research Thermocycler for 27 cycles at an annealing temperature of 45° C. The expected 540 bp fragment was visualized after electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

To rule out the presence of PCR inhibitors, all samples were also amplified in a different PCR reaction using primers for human genomic DNA (exon 1 of the alpha-iduronidase gene) as described by Matte et al. (24).

Serial dilutions of ATCC 259222 *E. coli* (10^8 to 10^1 ufc/mL) were submitted to PCR as described above to establish the method's detection limits. PCR for all dilutions was performed in triplicate.

Statistical analysis

Sensitivity was defined as the proportion of patients with a positive result (PCR or culture) divided by the number of patients with a PMN cell count > 250 cells/ μ L. Specificity was defined as the proportion of patients with a negative result (PCR or culture) divided by the number of patients with a PMN cell count ≤ 250 cells/ μ L.

Positive predictive value (PPV) was defined as the proportion of patients with a positive result (PCR or culture) and a PMN cell count > 250 cells/ μ L divided by all patients with a positive result (PCR or culture). Negative predictive value (NPV) was defined as the proportion of patients with a negative result (PCR or culture) and a PMN cell count ≤ 250 cells/ μ L divided by all patients with a negative result (PCR or culture).

The statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences, version 10.0 (Chicago, USA). The baseline characteristics of the patients are presented as median and interquartile range. For continuous variables with non-Gaussian distribution, Mann Whitney's U test was used. To assess the association among categorical variables, the chi-square test was used. A *p* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

The study was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Results

According to the criterion of PMN cell count and culture, eight ascitic fluid samples were classified as SBP and four as BA. Culture was positive in 4/8 cases of SBP. The following bacteria were identified: *E. coli* (2/4), *K. pneumoniae* (1/4) and *S. aureus* (1/4). The bacteria cultured in the four samples classified as BA were *E. coli*, *Salmonella* sp, *S. pneumoniae* and a Gram-positive rod. CNNNA was observed in 28/40 ascitic fluid samples (Table 1).

To SBP diagnose, the sensitivity, specificity, PPV and NPV of the BACTEC culture system was 50%, 85.7%, 50.0% and 87.5%, respectively (Table 2).

Amplification of bacterial DNA was positive in 7/8 cases of SBP, 3/4 cases of BA, and 8/28 cases with CNNNA (Figure 1). A blood culture was performed in 7/8 patients with CNNNA and amplification of bacterial DNA. A positive culture result was obtained in two cases (*S. aureus* and *Enterobacter* sp).

All the samples were positive for amplification of human genomic DNA. Thus, the presence of PCR inhibitors was ruled out. PCR detection limits were 10^5 ufc/mL (Figure 2).

The sensitivity, specificity, PPV and NPV of bacterial DNA amplification to diagnose SBP were 87.5%, 65.0%, 38.8% and 95.5%, respectively (Table 3).

Patients with CNNNA with or without bacterial DNA were compared in terms of severity of liver disease estimated by PELD score, serum to albumin ascites gradient, and rate of mortality in 3 months. There was no statistically significant difference between these two groups ($p=0.14$; $p=0.39$, $p=0.61$, respectively).

Discussion

In the present paper, we test the bacterial 16S rRNA gene amplification to diagnose ascites infection and compare the BACTEC culture system and bacterial 16S rRNA gene amplification in terms of sensitivity, specificity, PPV and NPV to diagnose SBP.

The culture of ascites using the BACTEC system yielded positive results in 50% of the ascitic fluid samples with a PMN cell count > 250 cells/ μ L. A Gram-negative rod was the most prevalent bacterium cultured. These results are similar to those we observed using conventional blood culture bottles. Despite an early report which indicated the superiority of the BACTEC system (25), more recent studies have suggested that the efficacy of BACTEC is similar to that of conventional methods (26-29).

The sensitivity, specificity, PPV and NPV of the BACTEC culture system showed that this method was able to detect 50% of the patients with SBP and to exclude 75% of those without infection. Therefore, the method had low sensitivity and good specificity. On the other hand, bacterial 16S rRNA gene amplification was able to identify 38.8% of the patients with SBP and to exclude 95.6% of those without SBP. Thus, 16S rRNA gene amplification was more sensitive than the BACTEC culture system, suggesting that the molecular method is more useful to identify patients at risk for SBP. Considering that SBP is associated with high morbidity and mortality, the consequences

of not treating infected patients can be disastrous. Thus the use of a more sensitive method, such as PCR, may contribute to improve diagnostic accuracy.

The results of BACTEC and 16S rRNA gene amplification were in agreement in seven samples (87.5%). 16S rRNA gene amplification did not identify one case with negative bacterial culture classified as SBP and another case classified as BA and caused by a Gram-positive rod. According to the literature, bacteria such as Gram-positive species and mycobacterium are often undetected by 16S rRNA gene amplification (15,20,21). This is due to the failure in disrupting these organism's cell walls, with a consequent failure in extracting DNA. Two effective measures to solve this problem are the addition of enzymes to the reaction and mechanical disruption of cells walls (15,20). Since the addition of enzymes increases the risk of contamination, mechanical disruption seems to be the best solution (15). We have not attempted to compare different methods to extract DNA in this study.

In our study, 8/28 (28.5%) patients with CNNNA had positive amplification of bacterial DNA. Blood culture was negative in six of these patients and revealed *S. aureus* and *Enterobacter* sp in two. The high sensitivity of PCR could suggest false-positive results in at least six of these patients. Sample contamination is the main cause for false-positive results in PCR (20,21). In our study, we tried to avoid contamination by performing DNA extraction in airflow chambers and PCR procedure were included of negative control.

Such et al. found bacterial DNA in the ascitic fluid samples of 9/28 patients (32.0%) with CNNNA. However, bacterial DNA was also observed in the blood of these patients, and molecular sequencing of these bacteria identified the same species in all positive samples (22). According to the authors, this rules out the possibility of contamination. In our study, 3 out of 8 patients with positive bacterial DNA and CNNNA died after three months, and one was listed to receive a liver transplant. However, when we compared these CNNNA patients with our CNNNA patients without bacterial DNA in ascites in terms of PELD score, serum to albumin ascites gradient and mortality in three months, no statistical difference was observed. Similarly, Child-Pugh classification, endoscopic and clinical features were not different in the patients studied by Such et al. in relation to DNA positivity.

The results of this study as well as those reported by Such et al. suggest that the presence of bacterial DNA in patients who do not meet cytological criteria of infection has no effect on their outcome, at least in the short term (22). We agree with Such et al.

that these positive results may signal the transitory presence of bacteria in ascitic fluid. The consequence of the presence of bacteria will depend of the bactericidal capacity of this fluid. Detection of BA in a symptomatic patient may be of interest since patients with BA may develop SBP within a few days (30), and the BACTEC culture system is unable to identify all these patients due to its low sensitivity.

On the other hand, our results show that bacterial 16S rRNA gene amplification was more sensitive than optimized culture to diagnose SBP, and suggest that PCR could be an effective method for screening this infection.

In the present study, some patients seemed to have bacterial DNA in ascites although they did not present clinical disease. This leads to the perception that amplification of bacterial DNA does not distinguish patients with ascitic fluid infection from those colonized by bacteria. On the other hand, there is no evidence that these patients were not in early stages of infection or that they presented BA. As noted by Such et al. (22), the clinical implications of this finding remain to be determined.

References

1. Ramachandran A, Balasubramanian KA. Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: its role in spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:607-612.
2. García-Tsao G. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *J Hepatol* 2001;34:150-155.
3. Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gómez G, Soriano G, Balanzó J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:145-150.
4. Solá R, Soriano S. How do bacteria reach the ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351-354.
5. França AVC, De Souza JB, Silva CM, Soares EC. Long-term prognosis of cirrhosis after spontaneous bacterial peritonitis treated with ceftriaxone. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:295-298.
6. Thuluvath PJ, Morss S, Thompson R. Spontaneous bacterial peritonitis – in-hospital mortality, predictors of survival, and healthy care costs from 1988 to 1998. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1232-1236.
7. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJV, Planas R, Bernard B, Inadomi JM and the International Ascites Club. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *J Hepatol* 2000;32:142-153.

8. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32(2):335-351.
9. Runyon BA, Canawati HN, Akrivadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988;95:1351-1355.
10. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998;27:669-674.
11. Rimola A, Salmerón JM, Clement J, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, Guarner C, et al. Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology* 1995;21:674-679.
12. Such, Guarner C, Runyon B. Spontaneous bacterial peritonitis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden: Blackwell Science, 1999:99-113.
13. Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155: 335-350.
14. Qian Q, Tang Y-W, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, Harmsen WS, et al. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3578-3582.
15. Rantakokko-Javala K, Nikkari S, Javala J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, Ruuskanen O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32-39.
16. Vanechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1997;40:188-194.
17. McCabe KM, Khan G, Zhang Y-H, Mason OE, McCabe ERB. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995;95:165-169.
18. Nikkari S, Lopez FA, Lepp PW, Cieslak PR, Ladd-Wilson S, Passaro D, Danila K, et al. Broad-range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:188-194.
19. Chesky M, Sealco R, Failace L, Read S, Jobin LF. Polymerase chain reaction for the laboratory of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:836-842.
20. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000;38:2574-2578.

21. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16 S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Clin Med Microbiol* 2003;52:685-691.
22. Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Castellás JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-141.
23. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, Krom RAF, et al. MELD and PELD: application of survival models of liver allocation. *Liver Transplant* 2001;7:567-580.
24. Matte U, Yogalingam G, Brooks D, Leistner S, Schwartz I, Lima L, Norato DY, et al. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab* 2003;78:37-43.
25. Sing N, Rihs JD, Gayowski T, Miele L, Yu VL. Improved detection of spontaneous bacterial peritonitis with BACTEC as compared with conventional culture methods. A prospective study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19:1-4.
26. Ortiz J, Soriano G, Coll P, Novella MT, Pericas R, Sabat M, Sanchez F, Guarner C, et al. Early microbiology diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis with Bact/ALERT. *J Hepatol* 1997;26:839-844.
27. Castellote J, López C, Gornals J, Tremosa G, Baliellas C, Domingo A, Xiol X. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 2003;37:893-896.
28. Evans LT, Ray Kim W, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003;37:897-901.
29. Thanopoulou A, Koskinas JS, Hadziyannis SJ. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002;33:194-198.
30. Chu CM, Chang KY, Liaw YF. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. *Dig Dis Sci* 1995;40:561-565.

Table 1. **Clinical and laboratory results of 31 pediatric patients and 40 ascitic fluid samples.**

Patient/ Paracentesis	Age (years)	Gender	Diagnosis Hypertension	Portal PELD	PMN (ascites)	Culture (ascites)	Bacterial DNA
1	2.9	F	Congenital hepatic fibrosis	3.0			
Paracentesis 1					34	Negative	Negative
Paracentesis 2					4	Negative	Negative
2	13.0	F	Cryptogenic cirrhosis	20.0			
Paracentesis 1					9380	<i>E. coli</i>	Positive
3	0.6	M	Cryptogenic cirrhosis	45.0			
Paracentesis 1					208	Negative	Negative
4	19.0	M	Biliary cirrhosis	17.0			
Paracentesis 1					90	Negative	Negative
5	9.6	M	Budd-Chiari syndrome	4.0			
Paracentesis 1					6	Negative	Negative
6	9.3	F	Cystic fibrosis	1.0			
Paracentesis 1					10	Negative	Negative
Paracentesis 2					138	Negative	Negative

7	1.3	M	Biliary atresia	17.0			
Paracentesis 1					720	Negative	Negative
Paracentesis 2					1400	<i>E. coli</i>	Positive
8	6.0	F	Budd-Chiari syndrome	- 0.6			
Paracentesis 1					2	Negative	Negative
9	0.5	M	Biliary atresia	26.0			
Paracentesis 1					8	Negative	Negative
10	20.2	M	Cryptogenic cirrhosis	22.0			
Paracentesis 1					624	Negative	Positive
11	13.9	F	Autoimmune hepatitis type 1	10.0			
Paracentesis 1					6	Negative	Negative
Paracentesis 2					560	<i>K. pneumoniae</i>	Positive
12	3.6	M	Congenital hepatic fibrosis	8.0			
Paracentesis 1					2	Negative	Negative
Paracentesis 2					8	Negative	Positive
13	0.8	M	Biliary atresia	54.0			
Paracentesis 1					90	Negative	Negative

14	0.9	F	Biliary atresia	18.0			
Paracentesis 1					30	Negative	Positive
Paracentesis 2					9	Negative	Negative
15	0.6	M	Galactosemia	20.0			
Paracentesis 1					4	Negative	Negative
16	1.0	M	Venocclusive disease	11.0			
Paracentesis 1					18	Negative	Negative
17	0.2	M	Idiopathic chronic liver disease	21.0			
Paracentesis 1					3	Negative	Negative
18.	11.3	F	Autoimmune hepatitis type 1	9.0			
Paracentesis 1					6.5	Salmonella sp	Positive
19	4.5	F	Hepatoblastoma	7.0			
Paracentesis 1					120	Negative	Positive
20	2.9	M	Budd-Chiari syndrome	15.8			
Paracentesis 1					162	<i>S. pneumoniae</i>	Positive
Paracentesis 2					217	Negative	Negative

21	12.0	M	Biliary atresia	28.0	258	Negative	Positive
Paracentesis 1					72	<i>E. coli</i>	Positive
Paracentesis 2							
22	6.9	F	Cryptogenic cirrhosis	21.0	0	Negative	Positive
Paracentesis 1							
23	11.9	F	Biliary cirrhosis	36.0	6	Negative	Negative
Paracentesis 1							
24	0.9	F	Biliary atresia	17.0	255	Negative	Positive
Paracentesis 1							
25	0.9	F	Biliary atresia	10.0	300	<i>S. aureus</i>	Positive
Paracentesis 1							
26	1.6	F	Biliary atresia	28.0	4	Negative	Negative
Paracentesis 1							
27	0.9	M	Biliary atresia	10.0	4	Negative	Negative
Paracentesis 1							
28	2.9	F	Biliary atresia	13.0	1	Negative	Positive
Paracentesis 1							

29	0.8	F	Biliary atresia	30.0	9	Negative	Positive
Paracentesis 1					66	Negative	Positive
Paracentesis 2							
30	0.3	M	Mucopolysaccharidosis VII	23.0			
Paracentesis 1					99	Negative	Positive
31	0.5	M	Galactosemia	23.0			
Paracentesis 1					10	Gram-positive rod	Negative

Table 2. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of BACTEC culture in ascites samples with and without infection.

BACTEC culture	PMN > 250 cells/μL	PMN < 250 cells/μL	Total
Positive	4	4	8
Negative	4	28	32
Total	8	32	40

Sensitivity: $4/8 = 50\%$; Specificity: $28/32 = 87.5\%$; Positive Predictive Value: $4/8 = 50.0\%$; Negative Predictive Value: $28/32 = 87.5\%$.

Table 3. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of PCR in ascites samples with and without infection.

Bacterial DNA	PMN > 250 cells/μL	PMN \leq 250 cells/μL	Total
Positive	7	11	18
Negative	1	21	22
Total	8	32	40

Sensitivity: $7/8 = 87.5\%$; Specificity: $21/32 = 65.6\%$; Positive Predictive Value: $7/18 = 38.8\%$; Negative Predictive Value: $21/22 = 95.5\%$.

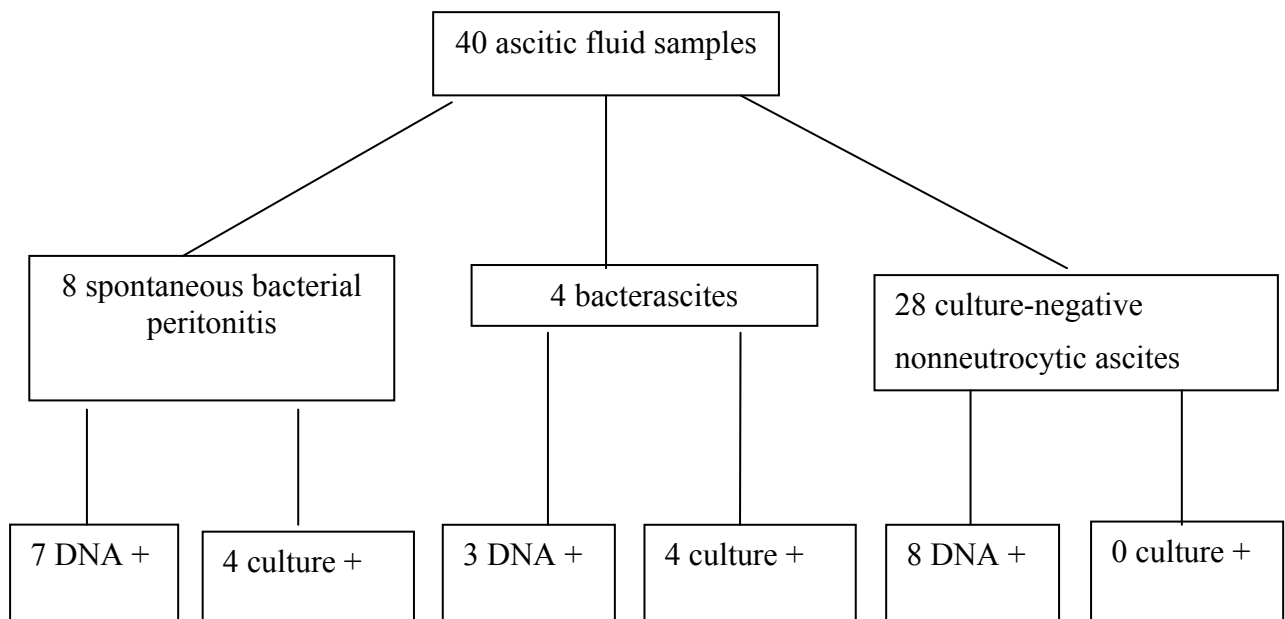


Figure 1. Results of PCR and ascites culture in patients with spontaneous bacterial peritonitis, bacterascites and culture-negative nonneutrocytic ascites. SBP: polymorphonuclear cell count > 250 cells/ μ L; BA: polymorphonuclear cell count ≤ 250 cells/ μ L and positive bacterial culture; CNNNA: polymorphonuclear cell count ≤ 250 cells/ μ L and negative culture.

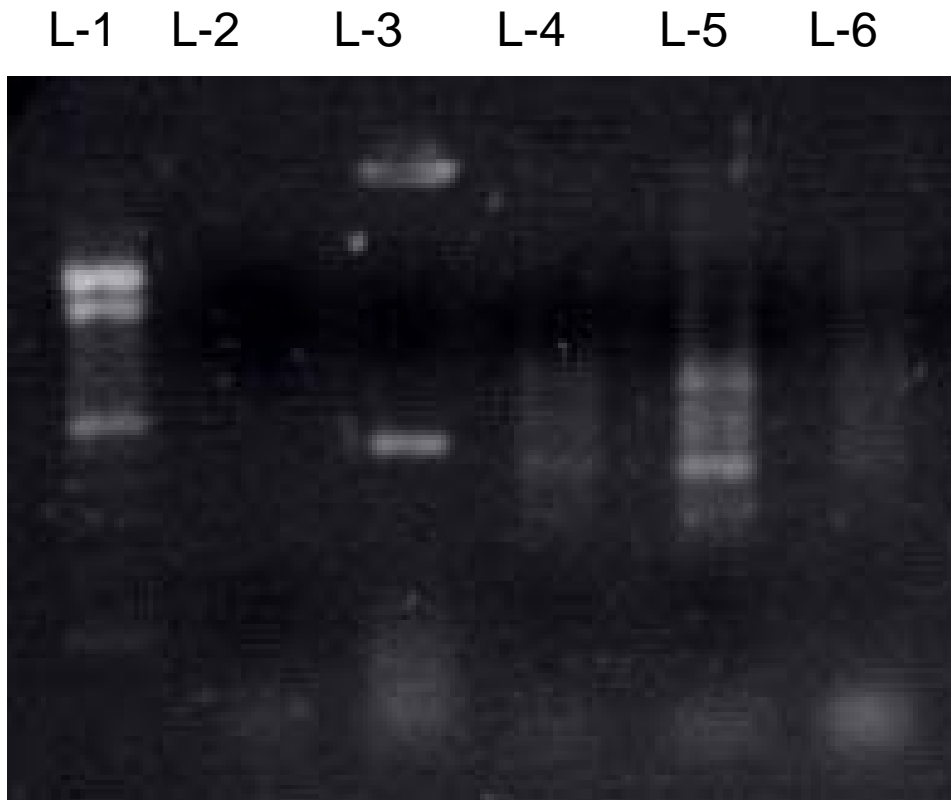


Figure 2. Electrophoresis on 1.5% agarose gel of 16S rRNA PCR product stained with Ethidium Bromide. Lane 1: 100 bp DNA ladder; lane 2: negative control; lane 3: positive control (*E. coli* ATCC 259222 10^8 ufc/mL); lane 4: bacterascites; lane 5: spontaneous bacterial peritonitis; lane 6: culture negative nonneutrocytic ascites.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos capítulos mais interessantes da hepatologia refere-se à infecção da ascite no hepatopata crônico. Esta é uma complicação relativamente freqüente, de amplo espectro clínico e de prognóstico incerto. Enquanto alguns pacientes assintomáticos com BA podem resolver espontaneamente o que se denomina de “colonização” da ascite, outros podem progredir em pouco tempo para PBE.

Os pacientes com PBE têm habitualmente um prognóstico reservado. A mortalidade por PBE em adultos cirróticos se situa em torno de 20% a 40% (Thuvalath *et al*, 2001; França *et al*, 2001; Coral *et al*, 2002). A probabilidade de recorrência é grande, podendo alcançar níveis tão altos quanto 70% em 1 ano, em pacientes sem antibioticoterapia profilática (Ginés *et al*, 1990). França *et al* estudaram o prognóstico a longo prazo de 47 pacientes adultos cirróticos com PBE tratados com cefotaxime. A infecção foi resolvida em 67% dos casos, a recorrência em 1 ano foi de 44%, e as taxas de mortalidade foram 32% no primeiro mês e 69% nos próximos seis meses (França *et al*, 2001).

Os fatores relacionados ao prognóstico desses pacientes são: a presença de insuficiência renal, o aparecimento de hemorragia digestiva, a hiponatremia e o prolongamento do tempo de protrombina. (Mihás *et al*, 1992; França *et al*, 2001; Perdomo Coral *et al*, 2003). Em casuística do nosso meio, a mortalidade por PBE associada à insuficiência renal progressiva atingiu valores de 100% (Perdomo Coral *et al*, 2003).

Neste estudo, em 31 crianças e adolescentes com ascite por hipertensão porta, a maioria com cirrose, estudamos 41 amostras de ascite e observamos uma taxa de infecção da ascite de 29,3% (12/41) sendo 8 casos de PBE e quatro casos de BA.

Os pacientes estudados por nós com ascite infectada não apresentaram características clínicas ou laboratoriais que pudessem distingui-los daqueles com ascite não infectada a não ser o número de polimorfonucleares maior que 250 células/ μ L e/ou a evidência direta de microrganismos patogênicos no fluido ascítico. A análise estatística sugeriu que as concentrações séricas de albumina eram significativamente mais baixas nos pacientes infectados. Como todos os pacientes infectados eram cirróticos, e houve uma diferença significativa entre a presença de cirrose e o diagnóstico de infecção da ascite, supomos que isto talvez fosse um espelho da síntese hepática defeituosa presente nesses pacientes. Se assim fosse, esperaríamos diferenças significativas entre o escore PELD, a classificação de Child-Pugh e outros parâmetros de avaliação da função hepática, o que não foi observado. Esses parâmetros foram avaliados, e nenhuma diferença foi demonstrada. A concentração sérica de

albumina, contudo, não reflete só a síntese dessa proteína, mas também sua excreção renal e intestinal e está inversamente relacionada ao volume de distribuição nos líquidos orgânicos (Hoefs, 1999). Os níveis de uréia e creatinina não são bons parâmetros de função renal em crianças (Springate *et al*, 1992; Montini *et al*, 2003). Dada a natureza retrospectiva de boa parte deste estudo, não nos foi possível utilizar métodos mais adequados para estimar a função renal dos pacientes.

Dos pacientes estudados, 50.0% (5/10) morreram dentro de um ano do episódio de ascite infectada, incluindo um paciente com BA. Isto sugere que, em crianças e adolescentes, essa complicação parece também se relacionar às altas taxas de mortalidade. Para Such *et al* (1999), a prática rotineira da paracentese e o uso de drogas pouco nefrotóxicas para o tratamento, especialmente da PBE se constituiu em um avanço no manejo desses pacientes (Such *et al*, 1999).

Em relação ao diagnóstico, Runyon *et al* (1988) publicaram os resultados referentes à inoculação de ascite em frascos de hemocultura, à beira do leito do paciente. Essa “nova” técnica elevou a positividade da cultura da ascite de 43% para 93% (Runyon *et al*, 1988) e permitiram a identificação da BA, como uma variante da PBE (Runyon *et al*, 1990). Esse método tem sido utilizado largamente, entretanto, fora de ensaios clínicos padronizados, a positividade da cultura está estimada em torno de 40% (Rimola *et al*, 2000).

Posteriormente, Singh *et al* compararam o método da cultura convencional otimizado com a inoculação da ascite em frascos de cultura automatizada, o BACTEC e encontraram uma positividade superior ao meio convencional (25% X 79%, respectivamente). Seus resultados entretanto não foram reproduzidos por outros autores (Ortiz *et al*, 1997). Os estudos mais recentes referentes ao diagnóstico de PBE utilizaram o método automatizado, e a positividade da cultura continuou baixa. Foi de 24,7% na casuística de Thanopoulou *et al* (2002) e de 40.0% naquela de Evans *et al* (2003)

No nosso estudo, a positividade da cultura da ascite por inoculação do material em frascos de BACTEC foi de 50.0% (4/8) considerando-se exclusivamente PBE e de 66.7% (8/12) se considerarmos a infecção de ascite de uma maneira geral.

É consenso que o diagnóstico de PBE deva ser feito com base no número de polimorfonucleares na ascite > 250 células/ μ L e que aqueles pacientes com celularidade menor que esse ponto de corte e resultado positivo da cultura sejam classificados como BA (Rimola *et al*, 2000).

Recentemente, Castellote *et al* demonstraram bons resultados com o uso da fita-teste para a estearase leucocitária em ascite com suspeita de infecção (Castellote *et al*, 2003). O

método é de uso corriqueiro para o diagnóstico de infecção urinária, de baixo custo, de fácil execução e, mais importante, na experiência desses autores, o valor preditivo negativo foi de 99%. Apesar de ainda não sabermos sobre a reprodutibilidade dos resultados de Castellote *et al*; este é mais um método de diagnóstico indireto de infecção. A enzima estearase presente nos leucócitos da amostra clínica em estudo, reage com um composto químico da fita reagente, determinando o aparecimento de uma coloração azulada (Castellote *et al*, 2003). Segundo Runyon (2003), a presença ou a ausência, tanto de leucócitos, quanto de bactérias na ascite é um processo dinâmico. A maioria dos pacientes com BA resolve espontaneamente o processo de colonização bacteriana, enquanto outros evoluem rapidamente para PBE. Assim, os pacientes com BA devem ser observados e tratados na vigência de PBE e/ou deterioração clínica (Rimola *et al*, 2000). Os pacientes com BA por definição, não apresentam valores elevados de PMN na ascite, deste modo, o teste da estearase leucocitária não detecta os casos de BA.

Desde a descrição da técnica de reação em cadeia da polimerase, por Mullis *et al* (Saik *et al*, 1985), as técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas cada vez mais, como método diagnóstico em situações em que a cultura convencional mostra baixa sensibilidade. Vários estudos têm demonstrado a superioridade da biologia molecular no diagnóstico de infecções do sistema nervoso central (Chesky *et al*, 2000), da septicemia (Nikkari *et al*, 2002) e da endocardite (Kupilla *et al*, 2003), dentre outros. A utilização dos *primers* universais, que codificam subunidades dos genes de regiões conservadas das bactérias, tem permitido que a técnica detecte esses patógenos “às cegas” e que sejam posteriormente, identificados por seqüenciamento (Quian *et al*, 2001).

Uma vez que a técnica tenha sido padronizada, o procedimento da PCR pode ser realizado e gerar resultados em poucas horas. Entretanto, a possibilidade de amplificação de quantidades muito pequenas de DNA faz com que essa técnica esteja sujeita à contaminação (Harris & Hartley, 2003). O uso de um controle negativo é imprescindível. Neste estudo, o controle negativo foi rigorosamente testado. A possibilidade de inibidores da polimerase nas amostras clínicas é outra variável a ser controlada. No nosso estudo, cada amostra era testada para a amplificação do DNA humano, e não observamos negatividade em nenhuma amostra. O nosso limite de detecção de bactérias com a técnica foi de 10^5 ufc/mL, em concordância com um relato recente da literatura (Verma & Wade, 2003). Esperávamos um maior limite de detecção da técnica, e entretanto, como a concordância entre a técnica molecular e a cultura convencional e o número de neutrófilos foi alta (87,5%, cada), isto não parece ter se constituído em um problema. Uma amostra com PMN igual a 720 células/ μ L e outra com um

bacilo Gram positivo detectado na cultura convencional não foram identificados pela PCR. Isso pode se dever a dificuldades próprias da técnica de amplificação da subunidade 16S do gene rRNA, principalmente no que se refere à detecção de alguns gram positivos e espécies do gênero *Mycobacterium*, cuja parede celular não consegue ser rompida.

Comparativamente à cultura, a técnica da PCR demonstrou uma maior sensibilidade com um alto valor preditivo negativo (95,5%), sugerindo que a técnica da PCR pode ser usada como um método de triagem de PBE .

A detecção de DNA bacteriano nos pacientes com ascite cultura negativa, não neutrocítica (ACNNN) observada tanto no presente estudo quanto naquele de Such *et al* (2002) gera alguns questionamentos sobre o significado clínico desse achado. No presente estudo, os pacientes com DNA positivo e ACNNN não diferiram daqueles com DNA negativo no que diz respeito à gravidade da doença hepática estimada pelo escore PELD, ao gradiente de albumina soro-ascite ou à taxa de mortalidade em três meses. Na casuística de Such *et al*, os pacientes com DNA positivo e ACNNN também não apresentaram características clínicas diferentes daqueles com DNA negativo (Such et al, 2002).

A ascite, a despeito de ser um acúmulo patológico de fluido peritoneal, deve ser estéril. O achado de DNA bacteriano na ascite pode ser uma evidência de translocação de bactérias. Do mesmo modo, pode ser uma evidência de BA ou um achado precoce de PBE ou ainda, não ter qualquer significado clínico, em analogia à bacteriúria assintomática. Os resultados devem ser analisados com cautela. Sendo este, um estudo retrospectivo, nós não podemos inferir sobre o seguimento destes pacientes. Nos parece razoável, pensar que enquanto não se conhece o real significado clínico deste achado, talvez alguns desses pacientes devam ser manejados como aqueles portadores de BA: acompanhados de perto, repuncionados e iniciado tratamento adequado a critério clínico e/ou citológico.

6 CONCLUSÕES

1. A prevalência de infecção em 41 episódios de ascite nos pacientes estudados foi de 29,3% (12/41). Houve 8 casos de peritonite bacteriana espontânea e 4 casos de bacteriascrite.
2. A sensibilidade e a especificidade da cultura otimizada foram 50,0% e 85,7% respectivamente. O valor preditivo positivo foi de 50,0% e o valor preditivo negativo foi de 87,5 %.
3. A sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR foram 87,5% e 75,0%, respectivamente. O valor preditivo positivo foi de 38,8 %, e o valor preditivo negativo foi de 95,5%.
4. Entre os pacientes com polimorfonucleares na ascite < 250 células/mL e cultura da ascite negativa, aqueles com DNA bacteriano positivo não diferiram daqueles com DNA negativo no que diz respeito à gravidade da doença hepática, ao gradiente de albumina entre o soro e a ascite e à mortalidade em três meses.

REFERÊNCIAS

- Alberts b, Bray D; Lewis J et al. Tecnologia do DNA serocombinante. In: _____ *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997:291-333.
- Albillos, A; Cuervas-Mons, V; Millán, I *et al.* Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1990;98(1): 134-140.
- Almdal, TP & Skinhoj, P. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, diagnosis, and prognosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1977;22: 295-300.
- Almeida JFC. Proteínas de defesa do líquido de ascite nas hepatopatias crônicas. Tese de Mestrado, curso de Pós-graduação em Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, 1994.
- Alvarez MA, Bodini P, Reggiane A *et al.* Enterococcus gallinarum bactascites in a patient with active tuberculosis and HCV cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2681-2682
- Andronikou S, Welman CJ, Kader E. The CT features of abdominal tuberculosis in children. *Pediatr Radiol* 2002;32 (2):75-81
- Arroyo V, Bataller R. Historical notes on ascites in cirrhosis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*, Malden-Blackwell Science, Barcelona-Espanha; 1999:3-13
- Arroyo V, Colmenero J. Ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathophysiological basis of therapy and currenty management. *J Hepatol* 2003;38:S69-S89
- Arroyo V, Ginés P, Gerbes AL *et al.* Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhotics. *Hepatology* 1996;23:164-176
- Arroyo, V; Bernardi, M; Epstein, *et al.* Pathophysiology of ascites and functional renal failure in cirrhosis. *J. Hepatology* 1988;6:239-257.
- Attali P; Turner K; Pelletier G *et al.* pH of ascitic fluid: diagnostic and prognostic value in cirrhotic and noncirrhotic patient. *Gastroenterology* 1986;90: 1255-1265
- Balistreri WF. Liver disease in infancy and childhood. In: Schiff ER; Sorrel MF, Maddrey WC, eds. *Diseases of the liver*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999:1357-1514.

- Bardi A, Sapunar J, Oksenberger D *et al.* Intrarenal arterial doppler ultrasonography in cirrhotic patients with ascites, with and without hepatorenal syndrome. *Rev Med Chil* 2002;130 (2):173-180.
- Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R *et al.* Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis* 2003;15:167-172
- Bundrick TJ, Cho SR, Brewer WH, Beachley MC. Ascites: comparison of plain film radiographs with ultrasonograms. *Radiology* 1984;152 (2):503-506.
- Caldwell SH, Battle EH. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Schiff E, Sorrel M, Maddrey W, eds. *Schiff's Disease of the Liver*, 8^a ed, vol 1, ed Lippincott-Raven, Philadelphia-PA-USA;1999: 503-544.
- Cárdenas A, Ortega R, Ginés P. The hepatocirculatory syndrome in cirrhosis. In: Arroyo V, Bosch J, Bruix J, eds . *Therapy in Hepatology*. Medicina stm, Barcelona-Espanha, 2001: 33-41.
- Castellote J, López C, Gornals J *et al.* Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagents strips. *Hepatology* 2003;37:893-896.
- Cereto F, Gasser I, Moreno G *et al.* Peritonitis bacteriana espontánea por *Haemophilus Influenzae* (Cartas al Director). *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:40-41.
- Chang C, Yang S, Kao CH *et al.* Small intestine bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:92-96.
- Chesky M, Scalco R, Failace L *et al.* Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58: 836-842.
- Chiva M, Guarner C, Peralta C *et al.* Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:145-150.
- Chu C-M, Chang K-Y, Liaw Y-F. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. *Dig Dis Sci* 1995;40:561-565.
- Cirera I, Bauer T, Navasa M *et al.* Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37.
- Conn, HO, Fessel, JM. Spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients caused by enteric bacteria. *Ann Intern Med* 1964;60: 568-580.

- Coral G, Mattos A, Damo D, Viéguas A. Peritonite bacteriana espontânea: avaliação e apresentação na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. *Rev AMRIGS* 2002;46:139-145.
- Coral G, Mattos A, Damo D, Viéguas A. Prevalência e prognóstico da peritonite bacteriana espontânea. Experiência em pacientes internados em um hospital geral de Porto Alegre, RS, Brasil (1991-2000). *Arq Gastroenterol* 2002;39:158-162.
- Curry, N; McCallum, RW, Guth, PH. Spontaneous peritonitis in cirrhotic ascites. A decade of experience. *Am. J. Dig. Dis* 1974;19: 685-692.
- Dalmau D; Layrargues GP; Fenyves D *et al.* Cefotaxime, Desacetyl-Cefotaxime, and Bacterial Activity in Spontaneous Bacterial Peritonitis. *J Infect Dis* 1999; 180: 1597-602.
- Das BB, Purohit A, Acharya U *et al.* Serum-ascites albumin gradient: a predictor of esophageal varices with ascites. *Indian J Pediatr* 2001; 68:511-514.
- De La Fuente-Aguado J, Bordon J, Esteban AR *et al.* Spontaneous non-typhoidal Salmonella peritonitis in patients with serious underlying disorders. *Infection* 1999;27:224-227.
- Devière J, Content J, Crusioux A *et al.* Il-6 and TNF α in ascitic fluid during spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 1991;36:123-124.
- Diitrich S, Yordi LM, Mattos AA .The value of serum-ascites albumin gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites. *Hepatogastroenterol* 2001;48:166-168.
- Dinis-Ribeiro M, Cortez-Pinto H, Marinho R *et al.* Peritonitis bacteriana espontânea em pacientes com cirrose hepática: avaliação de um protocolo de tratamento em unidades especializadas. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:473-477.
- Dinkel E, Lehnart R, Troger G *et al.* Sonography evidence of intraperitoneal fluid: an experimental study and its clinical significance. *Pediatr Radiol* 1984;14:299-303.
- Dore MP, Casce M, Realdi G. Helicobacter infection and spontaneous bacterial peritonitis (letter). *J Clin Microbiol* 2002; 40:1121.
- Evans LT, Ray Kim W, Poterucha *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis is asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003; 37:897-901.

- Failace LH. A reação em cadeia da polimerase no diagnóstico das meningites bacterianas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, 1999.
- Felisart G, Rimola A, Arroyo V *et al.* Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 1985;5:457-462
- Fernandez J, Navasa M, Gomez J *et al.* Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148
- Figueiredo FA, Coelho HS, Soares JA. Spontaneous bacterial peritonitis in hepatic cirrhosis: prevalence, predictive factors and prognosis. *Rev Assoc Med Bras* 1999;45:128-136.
- França AVC, De Souza JB, Silva CM *et al.* Long-term prognosis after spontaneous bacterial peritonitis treated with ceftriaxone. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:295-298
- Friedman SL. Hepatic Fibrosis. In: Schiff E, Sorrel M, Maddrey W, eds. *Schiff's Disease of the Liver*, 8^a ed, vol 1, ed Lippincott-Raven, Philadelphia-PA-USA;1999: 371-386.
- García-Tsao G, Lee FY, Barden GE *et al.* Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841
- García-Tsao G. Treatment of spontaneous bacterial peritonitis. In: Arroyo V, Bosch J, Bruix J, Ginés P, Navasa M, Rodés J (eds). *Therapy in hepatology*. Medicina stm, Barcelona-Espanha;2001:59-63.
- Garcia-Tsao, G, Conn, HO, Lerner, E. The diagnosis of bacterial peritonitis: comparison of pH, lactate concentration and leukocyte count. *Hepatology* 1985;5: 91-96.
- Garcia-Tsao, G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology Clinics North America* 1992;21(1): 257-275.
- García-Tsao. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *J Hepatol* 2001;34:150-155
- Ginés P, Rimola A, Planas R *et al.* Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990;12:716-724
- Gitlin, N; Stauffer, JL & Silvestri, RC. The pH of ascitic fluid in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1982;2: 408-411.

- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A *et al.* PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-351
- Guarner C, Runyon B, Young S *et al.* Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26:1372-1378
- Hardy S, Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. In: Suchy FJ, Sokal RJ, Balistreri WF, eds. *Liver Disease in Children*, Lippincott Williams & Wilkins, New York-USA; 2001:89-128.
- Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rRNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003;52 (Pt 8):685-691
- Hausmann R. Clones. In: Hausmann, R; ed. *História da biologia molecular*. Soc Bras de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo- Brasil 1997: 204-211
- Hoefs J. Characteristics of ascites. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden:Blackwell Science, 1999:25-41
- Hoefs JC, Barnes T, Halle P. Intra-peritoneal coagulation in chronic liver disease ascites. *Dig Dis Sci* 1981;26:518-522.
- Hoefs, JC. Diagnostic paracentesis: a potent clinical tool. *Gastroenterology* 1999;98: 230-236..
- Hoefs, JC. Increase in ascites white blood cell and protein concentrations during diuresis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1981;1: 249-254.
- Hoefs, JC; Canawati, HN; Sapico, FL *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1982;2: 399-407.
- Hurwich DB, Lindor KD, Hay JE *et al.* Prevalence of peritonitis and the ascitic fluid protein concentration among chronic liver disease patients. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1254-1257.
- Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38:257-2578.
- Kaymakoglu S, Eraksoy H, Okten A *et al.* Spontaneous ascitic infection in different cirrhotic groups: prevalence, risk factors and the efficacy of cefotaxime therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:71-76

- Kramer RE, Sokol RJ, Yerushalmi B, *et al.* Large-volume paracentesis in the management of ascites in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2001;33 (3):245-249.
- Kupila L, Rantakokko-Javala K, Javala J *et al.* Aetiological diagnosis of brain abscesses and spinal infections: application of broad range bacterial polymerase chain reaction. *J Neurosurg Psychiatry* 2003;74:728-733
- Larcher V.F., Manolaki N., Vegnent A *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis in children with chronic liver disease: Clinical features and etiologic factors. *J Pediatr* 1985;106: 907-912.
- Liou T-C, Chang T-T, Young K-C *et al.* Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992;37:197-202.
- Llovet JM, Bartoli R, March F *et al.* Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-313
- Maathius JB, Vanlook PFA, Michie EA. Changes in volume, total protein and ovarian steroid concentration of peritoneal fluid throughout the human menstrual cycle. *J Endocrinol* 1978;76:123-133.
- Mandell GL, Petri Jr AW. Antimicrobial agents:penicillins, caphalosporins and other β -lactam antibiotics. .In:Goodman Gilman A, Molinoff PB, Ruddon RW, Hardman JK, Linbird LE, eds. The pharmacological basis of therapeutics. Coopright. New York-USA;1996:1073-1102.
- Mattos AA, Silveira TR, Pereira Lima J *et al.* Ascites in children: the role of albumin gradient in diagnosis. *Acta Hepatologyca* 1991;2:74-74
- Mattos, AA & Lima, JP. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) and its variants in a general hospital in Brazil. *J Hepatology* 1992;16 (suppl. 1): S102.
- Mattos, AA. Peritonite bacteriana espontânea e suas variantes; epidemiologia, diagnóstico e história natural. *GED* 1994;13: 97-108.
- McCabe KM, Khan G, Zhang Y-H *et al.* Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995;85:165-169.

McDiarmid SV. Treatment of end-stage liver disease. In: Walker S, Durie P, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, eds. Pediatric gastrointestinal disease. Montreal-Canada, 2000:1250-1271.

Mene A, Sharma D, Raina VK. Correlation between serum-ascites albumin concentration gradient with gastrointestinal bleeding in patients of portal hypertension. Trop Doct 2003;33:39-41.

Mihai AA, Toussaint J, Hsu S *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: clinical and laboratory features, survival and prognostic indicators. Hepatogastroenterol 1992;39:520-522

Montini G, Pisanello L, Testa S *et al.* Urea percentiles in children with chronic renal failure. Data from the Italkid project. Pediatr Nephrol 2003;18:261-265.

Moore KP, Wong F, Gines P *et al.* The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the international ascites club. Hepatology 2003;38:258-266.

Navasa M, Fernández J, Rodés J. Prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis. The problem of spontaneous bacterial peritonitis by quinolone-resistant bacteria. In: Arroyo V, Bosch J, Bruix J, Ginés P, Navasa M, Rodés J, eds. Therapy in hepatology. Barcelona, Medicina stm, Barcelona-Espanha; 2001:65-68.

Nikaki S, Lopez FA, Lepp PW *et al.* Broad range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. Emerg Infect Dis 2002;8:188-194

Nolla-Salas J, Almela M, Gasser I *et al.* Spontaneous *Listeria monocytogenes* peritonitis: a population-based study of 13 cases collected in Spain. Am J Gastroenterol 2002;97:1507-1511

Perdomo Coral G, Alves de Mattos A. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis: incidence and prognosis. Can J Gastroenterol 2003;17:187-190

Perez-Paramo M, Munoz J, Abillos A *et al.* Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. Hepatology 2000;31:43-48

Pinto RB, Silveira TR. Trombose da veia porta em crianças e adolescentes: série de 14 casos. Rev Assoc Med Rio Grande do Sul 2002;46:47-52.

Pinzello, G; Simonetti, R; Craxi, A; Di Piazza, S; Spano, C & Pagliaro, L. Spontaneous bacterial peritonitis: a prospective investigation in predominantly nonalcoholic cirrhotic patients. Hepatology 1983;3: 5454-549.

- Poddar U, Thapa BR, Prasad *et al.* Natural history and risk factors in fulminant hepatic failure. *Arch Dis Child* 2002;87:54-56
- Propst T, Propst A, Herold M *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis is associated with high levels of interleukin-6 and its secondary mediators in ascites fluid. *Eur J Clin Invest* 1993;23:832-836.
- Pruiboom WH, Boc DJ, Van Dijk APM *et al.* Levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, eicosanoids and cytokines in ascites of patients with liver cirrhosis, peritoneal cancer and spontaneous bacterial peritonitis. *Int J Immunopharmac* 1995;17 (5):375-384.
- Qian QF, Tang Y-W, Kolbert CP *et al.* Direct identification from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3578-3582
- Ramachandran A, Kunissery AB. Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: its role in spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:607-612
- Rantakokko-Javala K, Nikkari S, Javala J *et al.* Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32-39.
- Raventos LC, Abad OL, Bartolomé R *et al.* Peritonitis espontánea por *Campylobacter* sp en pacientes con cirrosis hepática: Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *An Med Interna* 2002;19: 23-26
- Rendon Unceta P, Macias Rodriguez MA, Guillen Mariscal P *et al.* Renal doppler ultrasonography and its relationship with the renal function in patients with liver cirrhosis. *Med Clin (Barc)* 2001;116 (15):561-564
- Ricart E, Soriano G, Novella M, Ortiz *et al.* Amoxicillin-clavulanic acid versus cefotaxime in the therapy of bacterial infections in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2000;32: 596-602.
- Rimola A . Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. *Med Interna* 1987;5:161-224
- Rimola A, Soto R, Bory F *et al.* Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections. *Hepatology* 1984;4:53—58
- Rimola A; Garcia-Tsao G; Navasa M *et al.* Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *Journal of Hepatology* 2000;32:142-153.

- Rubstein P, Morales M, Pandiani A *et al.* Peritonitis bacteriana espontánea en cirrosis hepática com ascitis: incidencia, bacteriología y mortalidad en Uruguay. *Acta Gastroent. Latinoamer* 2001;31:307-311.
- Runyon B, Hoefs J. Peritoneal lymphomatosis with ascites: a characterization. *Gastroenterology* 1986;85:125-132.
- Runyon BA, Antillon MR. Ascitic fluid pH and lactate : insensitive and nonspecific tests in detecting ascitic fluid infection. *Hepatology* 1991;13:929-935
- Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1984;4:1209-1211
- Runyon BA, Montano AA, Akiviadis EA *et al.* The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992;117:215-220.
- Runyon BA. Amylase levels in ascitic fluid. *J Clin Gastroenterology* 1987;9:172-174.
- Runyon BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH. *Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*; W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA 1997: 1310-1333.
- Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure. *Arch Intern Med* 1986;146:2259-2261
- Runyon BA. Strips and tubes: improving the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis (editorial). *Hepatology* 2003; 37: 745-747.
- Runyon, BA & Hoefs, JC. Ascitic fluid analysis in the differentiation of spontaneous bacterial peritonitis from gastrointestinal tract perforation into ascitic fluid. *Hepatology* 1984;4: 447-450.
- Runyon, BA. Monomicrobial noneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1990;12:710-715
- Runyon, BA. Spontaneous bacterial peritonitis: an explosion of information. *Hepatology* 1988;8(1):171-175.
- Runyon, BA; Canawati, HN; Akiviadis, EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988;95;1351-1355.

- Saiki R, Scharf S, Fallona F *et al.* Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354..
- Schrier RW, Neiderberger M, Weigert A, Ginés P. Peripheral arterial vasodilatation: determinant of functional spectrum of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1994;14:14-22.
- Shneider BL. Portal Hypertension. In: Suchy FJ, Sokal RJ, Balistreri WF, eds. *Liver Disease in Children*, 2^a ed, ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-USA, 2001:130-151.
- Solá R, Soriano G. Why do bacteria reach the ascitic fluid? *Eur J Hepatol Gastroenterol* 2002;14:351-354.
- Sort P, Navasa M, Arroyo V *et al.* Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med*;1999;341:403-409.
- Spahr L, Morard I, Hadengue A, Vadas L, Pugin J. Procalcitonin is not an accurate marker of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2001;18:502-505.
- Springate JE, Christensen SL, Feld LG. Serum creatinine level and renal function in children. *Am J Dis Child* 1992;146:1232-1235.
- Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Castellás JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-141
- Such J, Guarner C, Runyon BA. Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*, Malden-Blackwell Science, Barcelona-Espanha; 1999:99-115.
- Tanaphoulou A, Koskinas J, Hadziyannis S. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002;13:194-198
- Targan, SR; Chow, AW & Guze, LB. Role of anaerobic bacteria in spontaneous peritonitis of cirrhosis. Report of two cases and review of the literature. *Am. J. Med.* 1997;62:397-403.
- Thivalath Pj, Mors S, Thompson R. Spontaneous bacterial peritonitis: in-hospital mortality, predictors of survival, and health care costs from 1988 to 1998. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1232-1236.

- Titó, L; Rimola, A., Ginès, P. *et al.* Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988;8(1): 27-31.
- Towner KJ, Cockayne A. Nucleid acid amplification and sequencing techniques. In: *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*. KJ Tower and A Cockayne. 93-112. Ed. Chapman & Hall. 1st edn. London,1993.
- Vaneechoutte M, Eldery JV. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1997;46:188-194
- Verma A, Wade JJ. New methods to confirm the cause of spontaneous bacterial peritonitis (letter). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;27:213-214
- Viallon A, Zeni F, Pouzet V *et al.* Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines. *Int Care Med* 2000;26:1082-1088
- Vieira S, Barth A, Ferreira C *et al.* Características bioquímicas da ascite estéril e da ascite infectada em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica. *Rev do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* 2002; 22: 211-212
- Vilaichone R-K, Mahachai V, Kullavanijaya P *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus bovis*: case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1476-1479
- Voigt MD, Trey C, Lombard C *et al.* Diagnostic value of ascites adenosine deaminase intuberculous peritonitis. *Lancet al* 1989;751-754.
- von Herbay A, Haussinger D. The use of colour-coded duplex sonography increases diagnostic accuracy of abdominal ultrasound. *Ultras Med* 2002;23(3):168-75.
- Yang, CY; Liaw, YF; Chu, CM & Sheen, IS. White count, pH and lactate in ascites in the diagnosis of spontaneous bacterail peritonitis. *Hepatology* 1995;5:85-90.

ANEXOS

ANEXO A**CONSENTIMENTO INFORMADO**

As pessoas com um tipo especial de doença do fígado que se chama cirrose freqüentemente acumulam líquido no abdome, formando o que chamamos de ascite. A ascite pode algumas vezes tornar-se “contaminada” por germes provenientes do sangue ou de órgãos abdominais como os intestinos e os rins ou órgãos da pelve como a bexiga, por exemplo. Sabemos que o desenvolvimento de “ascite contaminada” além de poder ser responsável por quadros de febre e dor abdominal nestes pacientes, pode também deixá-los mais comprometidos (os olhos e a urina podem ficar mais amarelados, o apetite e a disposição diminuem, a barriga aumenta de tamanho e pode ainda aparecer inchaço nas pernas e pés). O comprometimento do paciente com este tipo de complicação poderá ser bem menor se ela for logo detectada e tratada com antibióticos. Para isto é necessário o estudo do líquido acumulado no abdome que só é possível com a retirada de algumas quantidades deste por seringa. Introduzindo-se uma seringa com agulha comum ou com *butterfly* (agulha mais fina com um material na ponta em forma de borboleta), consegue-se facilmente obter este líquido. O procedimento é um pouco doloroso e praticamente não existem riscos: o risco mais comum é formar uma mancha azulada (hematoma) na parede do abdome que é raro quando o exame é feito com os devidos cuidados. O paciente não precisa estar internado nem ser anestesiado para fazer este “exame” e os pais, responsáveis ou pessoas próximas podem permanecer ao lado dele durante o procedimento, caso ambas partes desejem. Tão logo se colete o líquido é iniciado o tratamento que poderá ser mantido ou alterado conforme os resultados do seu estudo. Este resultado nos assegura tanto da existência da infecção quanto nos mostra, na maioria das vezes qual o germe que está sendo responsável por esta. A retirada de algumas quantidades de ascite é feita em todos os hospitais do mundo que cuidam de pacientes com cirrose e acontece independente de qualquer trabalho científico. No caso particular deste estudo, estaremos utilizando um método moderno e sofisticado para identificação mais rápida deste germe, sem que isto interfira na coleta habitual do líquido de ascite: só muda o que é feito no laboratório. No mesmo momento será coletado pequena amostra de sangue (5 ml) para exames.

Você e/ou seus familiares terão pleno acesso aos resultados. Participando ou não do estudo, você (seu filho), é claro estará recebendo orientação comprovadamente boa e caso

queira retirar-se do estudo (ou retirar o seu filho), estará livre para fazê-lo em qualquer momento que desejar. Havendo alguma pergunta a fazer antes de decidir, sinta-se à vontade para fazê-la.

Termo de Consentimento após Informação

Eu, _____ fui informado dos objetivos especificados em folha anexa e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebí informações específicas para cada procedimento no qual meu filho (a) estará envolvido (a), dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Sei ainda, que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa face à essas informações. Também fui informado (a) de que caso existam gastos, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Paciente

Responsável

Pesquisador

Orientador

ANEXO B**FICHA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE****1. Dados demográficos e clínicos**

Nome do paciente: _____ Prontuário: _____
 DN (idade): _____ Sexo: ()F ()M Cor: _____ Natural: _____
 Procedência: _____

Diagnóstico Principal: _____
 Diagnósticos Secundários: _____

Data da paracentese: _____
 Motivo da realização do exame (resumo): _____

Transfusão de albumina (considerar na semana avaliada): () S () N

Antibióticos (considerar últimas duas semanas): () S () N
 Qual (is)? _____

Diuréticos (data de início e dose): () S () N
 - Espironolactona: data: / / dose/kg: _____
 - Furosemide: data: / / dose/kg: _____
 - Outros: _____

1.1 Classificação de Child-Pugh

Av clínico-laboratorial	Pontuação		
	1	2	3
Grau de encefalopatia	nenhum grau 0	leve graus 1-2	mod a severa graus 3-4
Ascite	nenhuma	leve	mod a severa
Bilirrubina (mg/dl)	1-2	2,1-3,0	$\geq 3,1$
Albumina (g/dl)	$\geq 3,5$	2,8-3,5	$\leq 2,7$
TP (prolongamento em seg)	1- 4	4,1-6,0	$\geq 6,1$
Classificação de Child-Pugh A:5-6; B:7-9; C: 10-15			

* () EEG () Avaliação clínica neuro-ped

Pontuação: _____ pts Classificação: () A () B () C

função renal

Uréia (mg/dL):

Creatinina (mg/dL):

Outros:

Eletrólitos

Na (mEq/L):
(mg/dL):

K(mEq/L):

Mg (mEq/L):

Ca total

glicemia (mg/dL):

() jejum

() pós-prandial

albumina soro- ascite (g/dL):

Outros:

d) microbiologia

hemocultura:

antibiograma:

S:

R:

I:

coprocultura:

antibiograma:

S:

R:

I:

urocultura:

antibiograma

S:

R:

I:

ANEXO C

Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Child-Pugh	PELD	Motivo da paracentese
1	2,9	F	Fibrose hepática congênita	NC	3,0	Febre
2	13,0	F	Cirrose criptogênica	C	20,0	Encefalopatia
3	0,6	M	Cirrose criptogênica	C	45,0	Encefalopatia
4	19,0	M	Cirrose biliar	C	17,0	Ascite volumosa
5	9,6	M	Sínd de Budd-Chiari	NC	4,0	Ascite volumosa
6	9,3	F	Fibrose cística	C	1,0	Sangramento digestivo
7	1,3	M	Atresia biliar	C	17,0	Ascite volumosa
8	6,0	F	Sínd de Budd-Chiari + cirrose	B	- 0,6	Ascite volumosa
9	0,5	M	Atresia biliar	C	26,0	Ascite volumosa
10	20,2	M	Cirrose criptogênicaa	B	22,0	Encefalopatia
11	13,9	F	Hepatite autoimune tipo 1	C	10,0	Ascite volumosa
12	3,6	M	Fibrose hepática congênita	NC	8,0	Febre
13	0,8	M	Atresia biliar	C	54,0	Febre
14	0,9	F	Atresia biliar	C	18,0	Febre
15	0,6	M	Galactosemia	C	20,0	Ascite volumosa
16	1,0	M	Doença venoclusiva	NC	11,0	Ascite volumosa
17	0,2	M	Hepatopatia a esclarecer	NC	21,0	Ascite volumosa
18.	11,3	F	Hepatite autoimune tipo 1	B	9,0	Anasarca
19	4,5	F	Hepatoblastoma	NC	7,0	Ascite volumosa
20	2,9	M	Sind Budd-Chiari + Cirrose	B	15,8	Ascite volumosa
21	12,0	M	Atresia biliar	C	28,0	Febre
22	6,9	F	Cirrose criptogênica	C	21,0	Febre
23	11,9	F	Cirrose biliar	C	36,0	Febre
24	0,9	F	Atresia biliar	C	17,0	Febre
25	0,9	F	Atresia biliar	C	10,0	Febre
26	1,6	F	Atresia biliar	C	28,0	Febre
27	0,9	M	Atresia biliar	C	10,0	Febre
28	2,9	F	Atresia biliar	C	13,0	Ascite volumosa
29	0,8	F	Atresia biliar	C	30,0	Ascite volumosa
30	0,3	M	Mucopolissacaridose VII	NC	23,0	Febre
31	0,5	M	Galactosemia	C	23,0	Ascite volumosa

N-C = não cirrótico

ANEXO D

Características laboratoriais dos pacientes estudados

Paciente/ Paracentese	Hematócrito/ Hemoglobina	Leucócitos Totais	Neutrófilos/ Linfócitos	INR	AST /ALT (U/L)	BT/BD (mg/dl)	GGT/FA (U/L)	Albumina (g/dl)	Ur/Creat (mg/dl e g/dl)
1									
paracentese 1	15,5 / 4,7	11000	7590/ 2970	1,8	41 /10	1,3/0,4	61 /522	4,0	53,0 / 0,6
paracentese 2	29,0 / 9,2	7200	5616 / 1512	1,5	18 / 7	1,6 / 0,5	28 /269	3,8	122,0 / 0,6
2	29,0/9,2	6500	5200/780	1,2	126/41	16,5/12,3	150/420	1,7	35/0,6
3	17,4/5,9	30400	19760/6680	3,4	148/49	43,6/20,9	37/637	2,9	16/0,7
4	23,4/7,7	3290	2698/322,4	1,7	104/45	6,6/5,1	42/333	1,4	71/0,9
5	42,9/13,4	6000	3960/1380	1,5	48/30	1,2/0,4	137/574	4,8	40/0,5
6									
paracentese 1	32,9/10,4	4300	3096/903	1,7	34/27	0,7/0,2	16/540	2,9	25/0,5
paracentese 2	20,7 / 6,7	4100	3450/ 490	1,8	40 / 24	1,3 / 0,4	11 / 622	2,8	33 / 0,5
7									
paracentese 1	22,0/6,6	15500	12090/2790	1,2	135/91	16,5/9,5	104/803	2,5	16/0,4
paracentese 2	18,9/6,0	16200	13446/1320	1,3	121/165	16,6/9,8	121/760	2,2	32,0/0,6
8	35/10,2	5200	2860/2132	1,2	38/14	1,1/0,3	114/313	3,9	26/0,6
9	32,0/10,7	15800	6478/7584	1,6	198/104	19,7/7,6	123/1331	3,4	26/0,2
10	33,0/11,2	13200	12012/1056	1,9	38/36	6,7/3,7	29/344	2,4	28/0,8
11									
paracentese 1	14,0/4,6	7900	5767/1738	1,3	15/74	0,7/0,1	25/86	3,5	37/0,6
paracentese 2	18,0/6,0	16600	15272/996	1,7	326/2588	1,0/0,2	291/1156	2,6	127/1,0
12									
paracentese 1	27,2/8,6	5790	2023/3063	1,2	160/95	7,7/3,0	254/1862	3,9	17/0,2
paracentese 2	27,6/8,7	4870	1704/2678	1,3	861/40	1,8/0,8	171/775	2,6	21/0,3
13	23,0/7,1	5600	3192/1960	5,6	97/49	44,5/14,9	23/825	2,8	28/0,9
14									
paracentese 1	30,9/10,1	10330	4938/4111	1,5	86/34	2,9/1,7	91/4820	3,2	15/0,4
paracentese 2	34,1/11,2	8850	3628/4248	1,0	137/95	3,4/1,8	283/2347	2,9	13,0/0,3
15	21/5,8	8700	5481/3045	1,5	168/89	19,3/7,3	180/640	2,4	12/0,3
16	26,7/7,6	14700	10548/2646	2,1	230/246	2,8/1,7	51/376	3,0	50/0,6
17	23,4/7,8	15210	5369/7392	2,1	163/84	5,4/3,1	22/832	2,0	9,0/0,2
18	35/10,6	2100	1302/756	2,1	44/30	0,5/0,1	36/474	3,3	23/0,5
19									
paracentese 1	36,2/12,1	5700	3420/1938	1,1	82/20	20,2/12,1	135/540	4,1	10/0,6
paracentese 2	37,0/12,9	8900	6319/1780	1,0	78/15	27,4/13,7	85/540	4,3	10/0,6
20									
paracentese 1	32,0/10,8	13550	9349/2710	2,1	61/20	1,2/0,5	70/335	2,4	14/0,4
paracentese 2	32,0/10,3	7080	2336/4177	1,9	66/24	1,4/0,7	105/403	2,8	10/0,4
21									
paracentese 1	21,0/7,2	2600	2184/390	1,4	44/82	3,4/2,4	96/640	2,0	30/0,7
paracentese 2	24,0/8,7	10200	9834/612	1,9	43/35	9,8/6,7	82/568	1,8	44/0,4
22	25/7,8	11500	9775/1380	1,8	152/85	18,5/7,8	472/1029	1,9	30/0,5
23	26/8,3	6200	4154/1178	1,9	80/39	4,8/2,7	64/583	2,0	28/1,4
24	24/7,9	13300	7956/6579	1,4	260/186	34,6/17,2	89/495	2,2	21/0,6
25	28/7,3	6200	3906/1860	1,9	142/52	25,3/12,0	34/611	1,4	10/0,4
26	22,0/7,3	4300	2537/1462	1,1	204/24	12,8/5,2	50/1117	1,8	20/0,2
27	31,0/10,5	8700	6264/2175	1,9	547/267	22,7/10,9	28/1028	1,5	13/0,6
28	29,0/10,2	16800	9240/6888	2,1	181/42	15,7/7,8	77/953	1,8	15/0,3
29									
paracentese 1	28,9/10,1	6940	184/1040	1,1	263/97	11,7/7,3	422/714	3,5	13/0,7
paracentese 2	26,1/8,9	7470	5826/1195	1,2	324/255	9,9/5,6	363/795	3,1	20/0,3
30	23,9/7,9	11500	7797/2875	1,4	130/30	2,7/1,7	91/1386	2,0	38/0,3
31	23,0/7,3	10400	3120/6656	1,3	105/89	10,6/8,2	260/1340	2,5	25/0,4

AST: aspartato aminotransferase (VN \leq 40 U/L); ALT:alanino aminotransferase (VN \leq 42 U/L); BT: bilirrubina total (VN \leq 1,2 mg/dl); BD: bilirrubina direta (VN \leq 0,2 mg/dL); FA: fosfatase alcalina (\leq 15 anos: < 640 U/L; > 15 anos: homem: 80 – 300 U/L; mulher: 64-300 U/L); GGT: gama glutamiltransferase (VN \leq 36 U/L); albumina (VN = 3,5-5,5 g/dL); Ur = uréia (VN: 20-40 mg/dl); Creat = creatinina (VN: 0,5-1,0 g/dl)

ANEXO E

Resultados das análises citológica e bioquímica das amostras de ascite estudadas

Paracentese	Gradiente albumina soro-albumina ascite	Leuc Totais	PMN	pH	Proteínas Totais (g/dl)	Albumina (g/dl)	LDH (U/L)	ADA	Amilase (U/L)	Glicose (mg/dl)
1	2,3	85	34	7,2	3,7	1,7	92	7,5	12	94
2	1,7	10422	9380	7,5	0,4	0	109	13,2	24	84
3	2,0	832	208	7,6	1,9	0,9	169	8,0	25	
4	1,3	110	90	7,5	0,2	0,1	40	5,0	49	95
5	1,4	30	6	7,4	6,3	3,4	218	36,4	17	86
6	2,3	240	10	7,5	1,4	0,6	368	27,3	27	335
7	1,5	900	720	7,6	2,5	1,0	95	10,0	21	65
8	2,1	10	2	7,4	2,5	1,8	98	17,4	68	136
9	2,0	170	8	7,4	2,1	1,4	119	41,8	4	79
10	1,2	800	624	7,3	0,6	0,4	203	15,2	35	35
11	3,2	10	1	7,4	0,4	0,3	42	9,0	39	189
12	3,7	50	2	7,4	0,9	0,2	87	7,8	90	108
13	2,3	100	90	7,3	0,8	0,5	72	28,1	21	151
14	3,0	153	30	7,4	0,4	0,2	50	23,0	15	113
15	2,0	200	4	7,4	0,7	0,4	78	17,9	78	104
16	2,4	800	560	7,3	0,4	0,2	120	11,7	176	873
17	1,5	200	18	7,5	2,5	1,5	251	32,0	18	70
18	1,7	40	3	7,4	0,6	0,3	134	24,9	6	105
19	1,5	65	6,5	7,4	3,1	1,8	86	4,0	13	104
20	1,9	120	120	7,4	4,0	2,2	72	10,0	43	142
21	2,1	600	162	7,5	0,5	0,3	106	6,5	32	61
22	1,8	300	258	7,4	0,8	0,2	99	14,9	28	35
23	2,4	80	8,0	7,6	0,3	0,2	49	5,0	40	96
24	1,6	120	72	7,3	1,4	0,2	24	12,2	31	118
25	1,7	72	0	7,2	0,5	0,2	175	15,3	64	139
26	1,9	20	6	7,2	0,7	0,1	31	32,8	29	90
27	2,0	300	255	7,2	0,6	0,2	46	10,0	44	58
28	1,2	1000	300	7,4	1,0	0,2	109	29,4	17	93
29	1,7	2000	1400	7,3	1,7	0,5	235	13,8	29	100
30	1,5	9	4	7,3	0,7	0,3	94	9,0	55	95
31	1,4	25	4	7,3	1,8	0,1	73	15	5	113
32	2,2	91	27	7,4	4,2	2,1	157	23,0	58	86
33	2,5	45	9	7,5	0,5	0,4	99	19,6	12	103
34	2,3	256	217	7,4	1,0	0,5	86	16,0	34	118
35	1,7	60	1	7,4	0,3	0,1	127	13,0	28	81
36	2,8	66	9	7,4	1,1	0,7	83	16,0	18	130
37	3,0	195	66	7,4	1,1	0,1	93	13,0	23	113
38	1,1	496	99	7,5	2,3	0,9	426	20,0	16	71
39	2,5	363	138	7,5	0,7	0,3	94	21,7	8	177
40	2,2	120	10	7,5	0,7	0,3	61	22,0	3	83
41	2,31	43	4	7,3	3,5	2,5	203	12,6	29	92

Leuc Totais = leucócitos totais; PMN = polimorfonucleares; LDH = desidrogenase láctica; ADA = adenina deaminase

ANEXO F

Resultados dos testes de microbiologia e biologia molecular nas amostras de ascite estudadas

Amostras de Ascite	Coloração de Gram	Cultura Anaeróbia	Cultura Aeróbia	DNA humano	Amplificação do 16S rRNA
1	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
2	Negativa	Negativa	<i>E. coli</i>	Positivo	Positivo
3	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
4	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
5	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
6	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
7	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
8	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
9	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
10	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
11	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
12	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
13	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
14	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
15	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
16	Negativa	Negativa	<i>K pneumoniae</i>	Positivo	Positivo
17	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
18	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
19	Negativa	Negativa	<i>Salmonella</i> sp	Positivo	Positivo
20	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
21	Negativa	Negativa	<i>S. Pneumoniae</i>	Positivo	Positivo
22	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
23	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
24	Negativa	Negativa	<i>E. coli</i>	Positivo	Positivo
25	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
26	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
27	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
28	Negativa	Negativa	<i>S. aureus</i>	Positivo	Positivo
29	Negativa	Negativa	<i>E. coli</i>	Positivo	Positivo
30	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
31	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
32	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Material insuficiente
33	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
34	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
35	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
36	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
37	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
38	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Positivo
39	Negativa	Negativa	Negativa	Positivo	Negativo
40	Negativa	Negativa	Bac gram +	Positivo	Negativo
41	Negativa	Negativa	Negativo	Positivo	Negativo