

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**APLICAÇÃO DO ÍNDICE DE GRANULÓCITOS IMATUROS (IG) DO
HEMOGRAMA AUTOMATIZADO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL**

Wagner de Oliveira Monteiro

Porto Alegre, novembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**APLICAÇÃO DO ÍNDICE DE GRANULÓCITOS IMATUROS (IG) DO
HEMOGRAMA AUTOMATIZADO EM PACIENTES DOENÇA RENAL**

Trabalho apresentado na
Disciplina de Trabalho de
Conclusão do Curso de
Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Wagner de Oliveira Monteiro

Prof^a. Dra. Simone Martins de Castro

Orientadora

Suzane Dal Bó

Co-orientadora

Porto Alegre, novembro de 2016.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista *Clinical & Biomedical Research*, apresentadas em anexo, na qualidade de “Artigo Original”. Adequações serão elaboradas após as correções e sugestões da banca revisora.

APLICAÇÃO DO ÍNDICE DE GRANULÓCITOS IMATUROS (IG) DO HEMOGRAMA AUTOMATIZADO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL

Wagner de Oliveira Monteiro¹, Mariela Granero Farias², Suzane Dal Bó², Simone Martins de Castro^{1,3}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

² Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Serviço de Referência de Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Prof^a Dra. Simone Martins de Castro
Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Avenida Ipiranga, 2752, sala 304B, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000
E-mail: simonecastro13@gmail.com

Resumo

Introdução: Algumas patologias ou alterações fisiológicas, podem apresentar formas imaturas de granulócitos no sangue periférico (desvio à esquerda). Equipamentos automatizados possuem alarmes para a detecção de granulócitos imaturos e novos parâmetros que podem ser aplicados como biomarcadores têm sido propostos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação do índice IG do hemograma automatizado do equipamento Sysmex XE-5000 em pacientes com doença renal e estabelecer a normalidade em um grupo controle.

Métodos: Foi utilizado um grupo de doadores saudáveis para obter o valor de normalidade do IG no laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O grupo de pacientes com doença renal foi definido de acordo com o prontuário. Nesse grupo foram analisados valores de IG e exames bioquímicos como a proteína C reativa (PCR).

Resultados: O valor de normalidade de IG (n=115) foi de $0-0,06 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $0-0,63\%$. Entre os pacientes renais (n=117) a mediana encontrada foi de $0,04 \times 10^3/\mu\text{L}$ com intervalos interquartis de 0,02 e 0,16. Os valores de área sob a curva (ASC) obtidos para curva ROC entre PCR e IG# foi de 0,625. Entre PCR e IG% a ASC foi de 0,607.

Conclusões: O intervalo de normalidade encontrado se aproxima do intervalo de estudos anteriores. A sensibilidade e especificidade do IG em relação a PCR foi fraca na população pesquisada, porém estudos demonstram que a PCR não é um biomarcador preditivo ideal. São necessários estudos adicionais com outros biomarcadores disponíveis no mercado e grupos de paciente com diferentes condições clínicas para uma real avaliação da aplicação clínica do IG.

Palavras-chave: hemograma; automação; granulócitos imaturos; doença renal; Sysmex XE-5000; revisão microscópica; IG.

Abstract

Background: Some pathologies or physiological abnormalities may present forms of non-peripheral blood granulocytes (left shift). Automated equipment

brought new parameters such as the detection of immature granulocytes (IG) that may be useful as biomarkers. The objective of this study was to evaluate an application of the IG in hemograms of the Sysmex XE-5000 in patients with renal disease and establish normal values in a control group.

Methods: A group of healthy donors was used to obtain the normality value of IG in the laboratory of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The patients with renal disease were defined according to medical record. We analyzed IG counts and biochemical tests, such as a C-reactive protein (CRP).

Results: The normality value of IG (n=115) was 0 - $0.06 \times 10^3/\mu\text{L}$ and 0 - 0.63%. Among the renal patients (n=117) the median found was $0.04 \times 10^3/\mu\text{L}$ with interquartile ranges of 0.02 and 0.16. The area under the curve (AUC) values obtained for the ROC curve between PCR and IG# was 0.625. Between PCR and IG% the ASC was 0.607.

Conclusions: The range of normality is similar to that of previous studies. The sensitivity and specificity of the IG in relation to the PCR is poor in the population studied, however, studies demonstrate that the PCR is not an ideal predictive biomarker. Additional studies with other biomarkers available in the market and groups of patients with different clinical conditions is necessary for a real evaluation of the clinical application of IG.

Keywords: hemogram; automation; immature granulocytes; kidney disease; Sysmex XE-5000; microscopic review; IG.

Introdução

O sangue periférico de adulto é constituído, entre outros, por hemácias e leucócitos. Esses últimos são compostos predominantemente por neutrófilos segmentados, que possuem importância fundamental no ataque a infecções bacterianas, atuando como agentes da defesa imediata. Granulócitos imaturos são células presentes na medula óssea que, em situações normais, não são encontrados no sangue periférico. Entretanto, em algumas patologias ou alterações fisiológicas, podem estar presentes formas imaturas de granulócitos na corrente circulatória. O aumento da necessidade faz com que a medula óssea lance os granulócitos na corrente sanguínea antes que eles consigam se

diferenciar em granulócitos segmentados. Essa alteração recebe o nome de desvio à esquerda. Nesses casos, fatores de crescimento e citocinas, produzidos por macrófagos teciduais e outras células, induzem a liberação e produção de neutrófilos pela medula óssea fazendo com que haja a liberação de formas imaturas para o sangue periférico (1).

Além de infecções bacterianas, outras inúmeras situações clínicas como sepse, doenças inflamatórias agudas, necrose tecidual, doenças mieloproliferativas, uso de esteroides e outras drogas, anormalidades metabólicas como uremia, cetoacidose e eclampsia podem apresentar número de granulócitos imaturos anormalmente elevados na contagem diferencial do hemograma (2). Portanto, a presença da série imatura pode ajudar no diagnóstico prévio de infecções bacterianas agudas, aumentando a eficiência do tratamento e diminuindo a morbidade e mortalidade. Dessa forma, evidencia-se a importância da realização do hemograma, tanto na triagem quanto no diagnóstico e controle da evolução de doenças infecciosas ou crônicas, além de ser útil no acompanhamento de quimioterapias e radioterapias (3).

A forma clássica da execução do citológico diferencial do hemograma consiste na metodologia manual, através da distensão sanguínea e leitura microscópica. Entretanto, o advento da automação permitiu um maior grau de reprodutibilidade dos resultados de exames e rapidez nas suas determinações (4). Atualmente, a automação em hematologia permite determinar mais de 32 parâmetros relacionados às plaquetas, leucócitos e eritrócitos (5). Além disso, o hemograma automatizado também apresenta como vantagens: exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade, especificidade, alertas quantitativos/qualitativos e possibilidade de interfaceamento (5). A interpretação do hemograma pelo laboratório de hematologia, tanto em sistemas manuais, quanto através de automação completa, é um processo que requer conhecimento das limitações e da capacidade das plataformas de trabalho em uso para que possam produzir um resultado com controle de qualidade aprovado.

A avaliação da morfologia celular e contagem diferencial dos leucócitos é realizada através da distensão sanguínea corada pela técnica May-Grünwald Giemsa, derivada do método Romanowski (6). Normalmente, são contadas ao menos 100 células por examinador por lâmina de distensão nas técnicas

manuais (4), enquanto na automação, a contagem de leucócitos é realizada no canal diferencial (DIFF) podendo ser avaliadas até 32.000 células.

Os equipamentos automatizados de hematologia emitem alarmes chamados de “Flags” quando detectam alguma distribuição anormal de células. Esses “Flags” alertam para a necessidade de revisão, através de observação em distensão sanguínea por microscopia convencional. Os “Flags” fornecem subsídios morfológicos sobre todas as séries do hemograma, auxiliando na avaliação das lâminas (4). Entretanto, a realização da diferenciação morfológica de bastonetes por microscopia apresenta uma baixa sensibilidade na identificação dessas células, além de apresentar uma alta variabilidade entre os operadores (1).

O equipamento Sysmex® XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japão) é um instrumento automatizado capaz de identificar populações imaturas de leucócitos em dois canais diferentes. No canal diferencial (DIFF), que se baseia em citometria de fluxo, é possível obter a quantificação dos granulócitos imaturos informado pelo índice IG (granulócitos imaturos). O índice IG compreende o somatório de metamielócitos, mielócitos e promielócitos em relação a quantidade total de granulócitos no sangue. A sua contagem é determinada no mesmo momento em que os outros parâmetros do hemograma são liberados. O canal de informação sobre imaturidade mieloide (IMI) é um canal específico que utiliza radiofrequência e corrente direta (7) (8). O canal IMI, detecta blastos e neutrófilos bastonados, além de metamielócitos, mielócitos e pró-mielócitos (7). As informações, tanto em forma de “Flags” quanto de dados quantitativos fornecidas pelas automações em hematologia, auxiliam na avaliação do diferencial de leucócitos.

Novos equipamentos de hematologia estão disponíveis no mercado e disponibilizam novos parâmetros, entre eles para granulócitos imaturos, com a proposta de serem biomarcadores para diversas condições clínicas. A validação desses novos parâmetros do hemograma automatizado é fundamental na prática diária do laboratório de análises clínicas. É necessário que se tenha um conhecimento completo das informações dadas pelos equipamentos, para que sejam melhor utilizados tanto no diagnóstico quanto no prognóstico e acompanhamento de doenças.

A escolha de grupos específicos de pacientes para realizar a validação de alguns parâmetros do equipamento baseia-se, principalmente, no volume de hemogramas realizados diariamente pelo serviço e na importância de novas informações para o fechamento de diagnóstico clínico. Aproximadamente, 12% dos hemogramas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) são de pacientes com complicações renais. Na insuficiência renal, ocorre uma diminuição abrupta (aguda) ou gradual (crônica) da função renal, levando a um desequilíbrio na concentração hidroeletrólítica do organismo. A confirmação do diagnóstico é feita com o auxílio de exames bioquímicos diversos como dosagens séricas de ureia e creatinina. O tratamento pode ser medicamentoso, por meio da adequação de dieta, diálise ou transplante renal. O número de indivíduos acometidos por doenças renais cresce a cada ano, acarretando em um imenso aumento nos gastos dos serviços públicos e privados de saúde. Dependendo da gravidade do acometimento renal, muitas das nefropatias podem evoluir para severos estados de morbidade e, em muitos casos, para óbito (9).

Muitos parâmetros novos se mostram teoricamente úteis, mas sua utilidade clínica permanece ainda pouco documentada. Portanto, este trabalho teve como objetivo estabelecer e avaliar a aplicação do índice IG do hemograma automatizado do equipamento Sysmex® XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japão) em pacientes com doença renal. Além disso, pretendemos estabelecer um intervalo de normalidade para o índice IG em um grupo controle.

Métodos:

Para o estudo de validação do método foi seguido o protocolo "Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy" (<http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard/>). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (16-0390) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Amostras:

As amostras de sangue periférico são coletadas em tubos com ácido etilendiaminotetraacético dipotássico (EDTA-K2), transportados via sistema pneumático e processado pelo equipamento em até 3 horas. Foram revisados

os hemogramas de 2 diferentes grupos de pacientes processados na rotina do laboratório de hematologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) nos meses de agosto a outubro de 2016. Foram avaliados pacientes no grupo com doença renal, segundo análise dos prontuários do banco de dados do HCPA e um grupo controle. Foram incluídos no grupo de doença renal, pacientes que realizaram transplante em algum momento ou possuem alguma complicação renal, de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID-10). Os seguintes dados foram extraídos dos prontuários: procedência da solicitação do hemograma, idade do paciente, sexo, diagnóstico atual; presença ou ausência de alarmes no equipamento associados a presença de granulócitos imaturos (índice IG), resultados do diferencial manual, concentração de ureia e creatinina sérica, proteína C reativa plasmática e hemocultura quando disponíveis.

Os dados do grupo controle foram obtidos dos resultados de hemogramas de doadores do banco de sangue do HCPA que o laboratório utiliza como prática de controle interno da qualidade. Essas amostras controle devem preencher os critérios baseados em faixas específicas para os parâmetros como células vermelhas, hemoglobina, volume corpuscular médio, leucócitos, plaquetas e extensão de distribuição das células vermelhas (RDW - Red Cell Distribution Width). Foi realizada a análise manual, por 2 analisadores altamente experientes, contando 100 leucócitos por lâmina, cada um, no grupo controle.

Metodologias:

Os hemogramas foram realizados no sistema automatizado de hematologia Sysmex XE-5000 que utiliza, no canal DIFF, a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente para a contagem diferencial dos leucócitos (10). A citometria de fluxo utiliza a emissão de luz de proteínas coradas (DNA e RNA) a fim de separar as células de acordo em subpopulações através de programas de análise de diagrama de dispersão. O canal IMI baseia-se principalmente nas diferenças de membrana entre células maduras e imaturas. As células mais imaturas possuem menos lipídios alterando seu comportamento na presença do reagente lisante (8). O IMI utiliza foco hidrodinâmico para a detecção do tamanho das células através da alteração da resistência da corrente direta. A radiofrequência é utilizada para a detecção da densidade no interior das células (tamanho do

núcleo e presença de grânulos). O canal DIFF, possui um alarme específico capaz de realizar a contagem de IG (“Presença de IG”) que atua juntamente com o alarme de imaturidade do canal IMI. O alarme “Presença de IG” considera a proporção entre granulócitos imaturos e a quantidade total de neutrófilos (7). O laboratório de hematologia do HCPA definiu os valores para IG inferiores a 2% ou $0,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ como limites de referência. Acima desses valores o aparelho emite o “Flag” “Presença de IG”.

Os resultados dos hemogramas em um grupo controle foram utilizados para definir os valores de corte para o índice IG e, posteriormente, avaliá-lo entre os pacientes com doença renal. Este índice também foi comparado com outros alarmes emitidos pelo equipamento para granulócitos imaturos e correlacionados com as contagens microscópicas manuais e com outros exames bioquímicos (creatinina, ureia, proteína C reativa e hemocultura)

A dosagem de proteína C reativa (PCR) foi realizada através do método cromogênico. Os níveis séricos de ureia foram medidos pelo método enzimático de Roch-Ramel. A quantificação da creatinina sérica foi realizada por ensaio colorimétrico cinético, método de Jaffé sem desproteinização. Para esses testes foram utilizados o equipamento Cobas® 8000 c702 (Roche, Basel, Suíça) e kits comerciais da Roche. A hemocultura foi realizada por cultivo automatizado de monitoração contínua com uso de tecnologia colorimétrica para detecção de liberação de CO₂ em caso positivo para crescimento microbiano. O aparelho utilizado para a hemocultura foi o Bact/Alert®3D (BioMérieux Marcy-l'Étoile, França) e os frascos Bact/Alert Aerobic FA e Bact/Alert PF, também da fabricante BioMérieux. Todos os exames acima citados foram realizados nos laboratórios de bioquímica e de microbiologia do Serviço de Patologia Clínica e os resultados extraídos do prontuário online (AGHUse) do HCPA.

Análise estatística:

Os dados obtidos foram plotados e organizados em planilha do Microsoft Office Excel® 2007. A análise estatística foi realizada através do programa Statistical Package for the Social Sciences 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Valor de p bilateral menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A performance diagnóstica foi avaliada por análise de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) da relação de sensibilidade e especificidade entre os

valores de proteína C reativa e os valores de IG e de neutrófilos. A correlação entre os valores de leucócitos totais e IG foi feito pelo teste de Spearman para amostras não-paramétricas. Foi feito cálculo da distribuição das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk. A presença de granulócitos imaturos nas distensões foi correlacionado com IG e com a presença de bastões pelo teste U de Mann-Whitney. Após foram analisados o grau de associação qui-quadrado e de concordância pelo índice Kappa.

Resultados

Foram utilizadas amostras de 232 pacientes, 115 no grupo controle e 117 com histórico de doença renal identificados por códigos do CID-10. Desses 117 pacientes, 66 (56,4%) já haviam realizado transplante (CID-10 Z94) enquanto os outros 51 (43,6%) apresentavam algum tipo de comprometimento renal sem realização de transplante. A mediana de idade dos pacientes renais foi de 56 anos, com valor mínimo de 19 e máximo de 80. No grupo controle, a mediana foi de 40 anos, variando entre 18 e 67 anos. A tabela 1 mostra a comparação dos dados do hemograma entre os grupos pesquisados. Além das medianas dos valores absolutos e relativos de IG (tabela 1), foram obtidos intervalos de percentis para esses parâmetros utilizando percentil 2,5 e percentil 97,5, onde foi estabelecido o intervalo de normalidade em 95% para os valores de IG# (IG absoluto) entre $0 - 0,06 \times 10^3 / \mu\text{L}$ e IG% (IG relativo) entre $0 - 0,63\%$ no grupo controle

Tabela 1. Dados descritivos do hemograma automatizado para o grupo com doença renal e grupo controle no equipamento Sysmex XE-5000.

	Controle			Renal			p valor
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Leucócitos (10 ³ /μL)	6,61	5,74	7,51	6,65	5,06	6,65	0,524
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	4,98	4,69	5,18	3,34	2,70	3,34	0,000
Hemoglobina (g/dL)	14,80	14,20	15,50	9,80	8,00	9,80	0,000
Hematócrito (%)	42,90	41,00	44,70	29,80	24,80	29,80	0,000
Plaquetas (10 ³ /μL)	225,0	195,0	268,0	202,5	164,0	202,5	0,024
IG# (10 ³ /μL)	0,01	0,01	0,02	0,04	0,02	0,16	0,000
IG%	0,20	0,10	0,30	0,70	0,30	1,60	0,000
Creatinina (mg/dL)	ND	ND	ND	2,95	1,80	4,81	-
Ureia (mg/dL)	ND	ND	ND	85,00	53,00	113,00	-
PCR (mg/L)	ND	ND	ND	21,00	5,30	93,40	-

Os p valores foram baseados em teste U de *Mann Whitney* para amostras independentes, acima de 0,05, considerados significativos. IG#: valor de granulócitos imaturos absoluto; IG%: valor de granulócitos imaturos relativo (%). PCR: proteína C reativa. ND: não disponível.

Entre os pacientes do grupo renal, a mediana encontrada de IG# e de IG% foram de 0,04x10³/μL com intervalos interquartis de 0,02 (percentil 25) e 0,16 (percentil 75) e 0,7% com intervalos interquartis de 0,3 (percentil 25) e 1,6 (percentil 75) (Tabela 1). Neste grupo, 34 pacientes (29,1%) apresentaram o “Flag” do canal DIFF, “Presença de IG”, enquanto apenas 13 (11,1%) apresentaram “Flag” específico para blastos, 28 (23,9%) para neutrófilos bastonados e 7 (6%) para granulócitos imaturos (Imm Gram?) do canal IMI . As dosagens dos exames bioquímicos foram analisados e estratificados em alterados e normais de acordo com seus respectivos valores de referência (dados não apresentado). Os valores séricos de creatinina estão fora dos valores de referência (0,7-1,2 mg/dL para homens e 0,5-0,9 mg/dL para mulheres) em 106 pacientes (90,6%). Os níveis séricos de ureia encontrados mostraram-se acima da faixa de referência, 16 a 48 mg/dL, em 94 pacientes (80,3%). Os dados plasmáticos de proteína C reativa só estavam disponíveis em 91 pacientes, dos quais 69 (75,8%) estavam acima do valor de referência (5mg/L). Apenas 53 pacientes possuíam resultados da hemocultura, dos quais, 15 apresentaram positividade para micro-organismos no sangue.

A precisão inter-ensaio foi calculada por controle e-Check(XE)® processada dez vezes no aparelho automatizado, em três níveis diferentes. O coeficiente de variação (CV) médio ficou em 5,10% (desvio padrão=0,30) para IG# e 5,13% (desvio padrão=0,46) para IG%, valores que se encontram

abaixo do limite de variação definido pelo fabricante que é de 24,1% para IG# e 20,9% para IG%.

Os valores de área sob a curva obtidos para curva ROC foram de 0,625 (Intervalo de confiança 95%, 0,467-0,719), entre PCR e IG# e 0,607 (Intervalo de confiança 95%, 0,434-0,707) entre PCR e IG% (Figura 1). Não foi realizado teste de sensibilidade e especificidade com o exame da hemocultura devido ao baixo número de pacientes com resultados (n=53) no prontuário online do hospital.

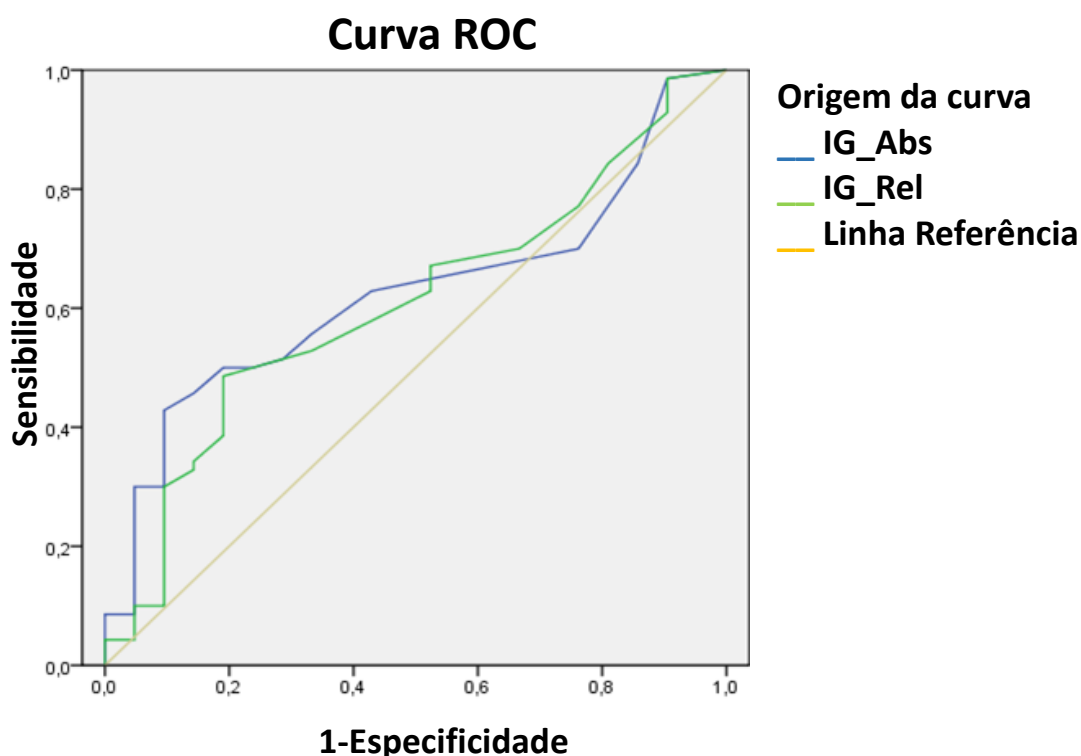


Figura 1. Curva ROC comparando IG e PCR

As amostras apresentaram distribuição assimétrica, identificadas através do teste de *Shapiro-Wilk*. Desta forma, foi optado por realizar o teste de correlação de *Spearman* entre os valores de leucócitos totais, neutrófilo absoluto e neutrófilo relativo e os valores de IG. O coeficiente de correlação r_s foi de 0,477 entre leucócitos totais e IG# e 0,479 entre neutrófilos absolutos e IG# (Tabela 2), o que corresponde a correlações moderadas.

Tabela 2. Correlação entre os valores de IG x valores de leucócitos e neutrófilos

	Leucócitos		Neutrófilos #		Neutrófilos %	
	rs	p valor	rs	p valor	rs	p valor
IG #	0,477	<0,0001	0,479	<0,0001	,081	0,387
IG %	0,174	0,061	0,190	0,040	,006	0,950

r_s: coeficiente de correlação de *Spearman* para amostras não-simétricas. P-valor <0,05 foram considerados significativos. IG#: valor de granulócitos imaturos absoluto; IG%: valor de granulócitos imaturos relativo (%).

Para relacionar a contagem de IG com a detecção de granulócitos imaturos no diferencial manual, utilizamos a faixa de normalidade encontrada no grupo controle - de 0 à 0,06 para IG# e de 0 à 0,63 para IG% - como ponto de corte. A tabela 3 mostra a relação entre os valores de IG e a presença de pelo menos um granulócito imaturo (pró-mielócito, mielócito ou metamielócito). Todos os resultados apresentaram $p < 0,05$ segundo teste de associação qui-quadrado de *Pearson*. O índice de concordância Kappa para os valores de IG absolutos foram de 0,637 ($p < 0,01$), o que indica uma concordância substancial com a detecção de granulócitos imaturos no diferencial manual. Para o IG relativo o índice Kappa foi de 0,411, demonstrando uma concordância moderada.

Tabela 3. Determinação do IG na presença ou ausência de granulócitos imaturos e bastões na contagem diferencial manual do hemograma de pacientes com doença renal.

	Granulócitos Imaturos				Bastões %			
	0 (n=85)	≥1 (n=32)	Total (n=117)	p valor	0 (n=109)	> 5 (n=8)	Total (n=117)	p valor
IG #	Abaixo de 0,06	69 (81,2%)	0	69 (59,0%)	69 (63,3%)	0	69 (59,0%)	0,001
	Acima de 0,06	16 (18,2%)	32 (100%)	48 (41,0%)	40 (36,7%)	8 (100%)	48 (41,0%)	
IG %	Abaixo de 0,63	52 (61,2%)	0	52 (44,8%)	52 (47,7%)	0	52 (44,4%)	0,009
	Acima de 0,63	33 (38,8%)	32 (100%)	65 (55,2%)	57 (52,3%)	8 (100%)	65 (55,6%)	

Valores de p com base em qui-quadrado exato de *Fischer* e de *Pearson* para valores categóricos. IG#: valor de granulócitos imaturos absoluto; IG%: valor de granulócitos imaturos relativo. PCR: proteína C reativa. Granulócitos imaturos: pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos.

A tabela 3 também apresenta a relação entre a porcentagem de bastões encontrados no diferencial com os valores de IG. Os mesmos valores, acima

citados, foram usados para definir o ponto de corte. A Sociedade Internacional de Laboratório Hematológico (ISLH) recomenda que cada laboratório defina os valores de referência para bastões de acordo com seus procedimentos de operação padronizados (11). O nosso laboratório definiu o valor de 5% como referência para bastões no sangue periférico. Os resultados apresentaram $p < 0,05$ segundo *Teste Exato de Fisher*. As concordâncias obtidas entre IG e presença de bastões foi fraca segundo o índice *Kappa* de concordância: 0,191 (IG#) e 0,111 (IG%).

Discussão

No campo das análises hematológicas, os analisadores automatizados nos oferecem diversos parâmetros, principalmente no diferencial dos leucócitos, como a quantificação dos granulócitos imaturos que nos permitem uma otimização do processo de liberação do hemograma. Entretanto, a revisão manual ainda é necessária em muitos momentos. A adoção de valores de normalidade é fundamental para que os casos verdadeiros positivos para revisão microscópica sejam detectados sem que haja um grande número de falsos positivos, prejudicando o andamento de exames a serem avaliados (11).

Cada laboratório deve determinar intervalos de referência durante o processo de validação de seus analisadores de hematologia (11). Intervalos de normalidade, tanto para leucócitos totais quanto para granulócitos imaturos (IG), variam de acordo com a idade dos pacientes e a população atendida por cada hospital (12). O intervalo de normalidade para IG encontrado pelo nosso estudo foi de $0 - 0,06 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $0 - 0,630\%$ utilizando os percentis 2,5 e 97,5. Esses valores estão abaixo de outros estudos descritos na literatura (13) (6), provavelmente devido ao tipo de amostra selecionada e aos rigorosos critérios utilizados entre o laboratório de hematologia e o banco de sangue do HCPA para a aceitação das amostras que foram utilizadas como grupo controle. Entretanto, encontramos valores semelhantes a estudos que também utilizaram doadores de sangue saudáveis. Bruegel et al (2011) obteve valores de referência de IG inferior à $0,03 \times 10^3/\mu\text{L}$ e 0,5%, utilizando os percentis 5 e 95 (14). Pekelharing et al (2011), com um n amostral de 309 doadores saudáveis, encontrou $0 - 0,06 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $0 - 0,6\%$, com intervalo de confiança de 95% (15). As medidas

de IG absolutas e relativas apresentaram excelente precisão intra-ensaio, utilizando controle de três níveis.

A quantidade de granulócitos imaturos em relação ao valor total de granulócitos é uma ferramenta clínica de valor preditivo de infecção bacteriana aguda. Entretanto, estudos demonstram que a razão entre neutrófilos não segmentados e segmentados seria um índice com acurácia muito melhor para avaliação da severidade de infecções bacterianas. A primeira etapa da infecção bacteriana, entre 12 e 24h, ocorre com uma diminuição dos leucócitos totais, sem aparecimento de desvio à esquerda no hemograma (17). Dessa forma, evidencia-se a necessidade de se obter biomarcadores precoces que cobrissem esse período de tempo crucial para o desenvolvimento da infecção. Atualmente, a proteína C reativa é uma proteína de fase aguda muito usada em diagnóstico de doenças infecciosas. Entretanto, seu valor preditivo para algumas patologias é contestado, já que seu pico plasmático não ocorre antes de 48 horas (18). Muitos biomarcadores, em particular, proteínas de fase aguda como procalcitonina (PCT), estão sendo investigados. A PCT é utilizada clinicamente como suporte para diagnóstico, mas devido ao seu elevado valor preditivo negativo (99%) é mais frequentemente usado para excluir sepse (2).

Na infecção bacteriana, os parâmetros de IG devem ser analisados estratificados por tempo, e não em uma única análise, devido às alterações drásticas na contagem de neutrófilos e leucócitos totais (17). Essa análise seriada pode ser uma alternativa também para outros grupos de patologias que podem envolver aumento de granulócitos imaturos no sangue periférico. Os nossos resultados demonstram que o valor de IG# nos pacientes com comprometimento renal, esteve correlacionado com os valores de leucócitos totais, sugerindo um possível valor clínico semelhante entre os dois parâmetros. Entretanto, grande parte dos nossos pacientes fazia uso dos medicamentos Tacrolimus ou Ciclosporina, imunossupressores que alteram as quantidades de leucócitos totais no sangue periférico (19).

Em 16 pacientes (18,2%) foram encontrados valores de IG acima dos valores de normalidade, delimitados pelo nosso estudo, sem a presença de ao menos um granulócito imaturo na revisão microscópica. A contagem diferencial manual é muito questionada devido à sua baixa sensibilidade, uma vez que cada analisador conta apenas 100 leucócitos. Em função destes resultados falso-

positivos, para se ter uma real avaliação do parâmetro do IG, seria importante testar a correlação entre o IG e algum outro biomarcador que apresente alta sensibilidade e especificidade. O mesmo deve ser levado em consideração em relação aos neutrófilos bastonados: 40 pacientes (36,7%) apresentaram valor de IG# alterados e 57 (52,3%) valor de IG% alterados, sem a presença de bastões no diferencial manual. Devemos nos questionar se os valores de IG elevados realmente significam resultados falsos positivos ou se eles não estariam precedendo a presença de bastões pela revisão microscópica manual.

A correlação diagnóstica entre PCR e IG não obteve valores significativos para o grupo com doença renal. Como dito anteriormente, o valor preditivo da PCR é questionável, utilizamos esse parâmetro por se tratar de um exame de fácil acesso e disponibilidade. Portanto, não devemos excluir a importância do IG e invalidar um possível valor preditivo apenas pelo resultado da comparação com os valores de PCR nessa população. São necessários estudos adicionais com outros biomarcadores disponíveis no mercado e grupos de paciente com diferentes condições clínicas para uma real avaliação da aplicação clínica do IG.

Referências

1. Cornbleet PJ. Clinical utility of the band count. *Clin Lab Med.* 2002;22(1):101–36.
2. Nierhaus A, Klätte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis--a prospective, observational study. *BMC Immunol.* 2013;14(1):1–8.
3. Laboratorial H, Cat U, Federal U. *Visão Acadêmica, Curitiba, v.14, . 2013. 99-108 p.*
4. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis Practical Haematology* [Internet]. 10th Ed Churchill LivingstoneElsevier. 2006. 722 p. Available from:
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Dacie+and+Lewis+Practical+Haematology,+10th+ed#0>
5. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8 II):1221–9.
6. Fernandes B, Hamaguchi Y. Automated enumeration of immature granulocytes. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(3):454–63.
7. Eilertsen H, Hagve TA. Do the flags related to immature granulocytes reported by the sysmex XE-5000 warrant a microscopic slide review? *Am J Clin Pathol.* 2014;142(4):553–60.
8. Cimenti C, Erwa W, Herkner KR, Kasper DC, Müller W, Resch B. The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):1429–32.
9. Souza ML De, Malagutti W, Rodrigues FSM, Barnabé AS, Francisco L, Silva RN Da, et al. Incidência de insuficiência renal aguda e crônica como complicações de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva. *ConScientiae Saúde.* 2010;9(3):456–61.

10. Briggs CJ, Linssen J, Longair I, Machin SJ. Improved flagging rates on the sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(2):309–16.
11. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36(3):219–25.
12. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(3):279–88.
13. Bernstein LH, Rucinski J. Measurement of granulocyte maturation may improve the early diagnosis of the septic state. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(12):2089–95.
14. Bruegel M, Fiedler GM, Matthes G, Thiery J. Reference Values for Immature Granulocytes in Healthy Blood Donors Generated on the Sysmex XE-2100 Automated Hematology Analyser. *Sysmex J Int.* 2004;14(1):4–6.
15. Pekelharing JM, Hauss O, de Jonge R, Lokhoff J, Sodikromo J, Spaans M, Brouwer R, de Lathouder S HR. Hematology Reference Intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Diagnostic perspectives.* 2010;1(1):1–11.
16. Senthilnayagam B, Kumar T, Sukumaran J, Jeya M, Rao K. R. Automated measurement of immature granulocytes: Performance characteristics and utility in routine clinical practice. *Patholog Res Int.* 2012;2012:1–6.
17. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta.* 2016;457:46–53.
18. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for Sepsis Diagnosis: What is Useful? *Crit Care Clin.* 2006;22(3):503–19.
19. Brum S, Nolasco F, Sousa J, Ferreira A, Possante M, Pinto JR, et al.

Leukopenia in Kidney Transplant Patients With the Association of Valganciclovir and Mycophenolate Mofetil. *Transplant Proc.* 2008;40(3):752–4.

Anexo 1

Clinical & Biomedical Research

Instruções aos Autores

Escopo e política

A Clinical and Biomedical Research (CBR), antiga Revista HCPA, é uma publicação científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). É um periódico científico de acesso livre que tem a finalidade de publicar trabalhos de todas as áreas relevantes das Ciências da Saúde, incluindo pesquisa clínica e básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais da revista.

A CBR apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] e do *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) [http://www.icmje.org/clin_trial.pdf]. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) <http://www.ensaiosclinicos.gov.br> ou de outro banco de dados oficial dedicados ao registro de ensaios clínicos. Todos os artigos publicados são revisados por pares anônimos. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, os seus direitos autorais são automaticamente transferidos para a revista. O conteúdo do material enviado para publicação na CBR implica que o mesmo não tenha sido publicado e não esteja submetido a outra revista. Artigos publicados na CBR, para serem publicados em outras revistas, ainda que parcialmente, necessitarão de aprovação por escrito dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores. O manuscrito deve enquadrar-se em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, conforme a seguir:

Forma e preparação de artigos

SERÃO CONSIDERADOS PARA PUBLICAÇÃO

Editorial

Comentário crítico e aprofundado, preparado a convite dos editores e submetido por pessoa com notório saber sobre o assunto abordado. Os editoriais podem conter até 1000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

Artigos de Revisão

Artigos que objetivam sintetizar e avaliar criticamente os conhecimentos disponíveis sobre determinado tema. Devem conter até 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar resumo, não estruturado com número não superior a 200 palavras (exceto revisões sistemáticas – ver estrutura de resumo em ‘Artigos Originais’) e uma lista abrangente, mas preferencialmente não superior a 80 referências. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Artigos Especiais

Manuscritos exclusivamente solicitados pelos editores, sobre tema de relevância científica, a autores com reconhecida expertise na área e que não se enquadrem nos critérios de Editorial.

Artigos Originais

Artigos com resultados inéditos de pesquisa, constituindo trabalhos completos que contêm todas as informações relevantes que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A sua estrutura formal deve apresentar os tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. A(s) conclusão(ões) deve(m) estar no último parágrafo da Discussão, não sendo necessária uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Para os artigos originais, deve-se apresentar um resumo estruturado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) em português e em inglês (Abstract), nos casos em que o artigo não for escrito na sua totalidade na língua inglesa. O Resumo e o Abstract não devem exceder 250 palavras.

Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Relatos de Casos

São artigos baseados em casos peculiares e comentários sucintos sobre a importância do caso em relação ao conhecimento atual na área. Devem conter até 1.000 palavras, com um total de, no máximo, duas tabelas ou figuras e 15 referências, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

A sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso;

Apresentação do caso (Relato do Caso) e Discussão. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve limitar-se a fatos pertinentes aos casos. O sigilo em relação à identificação dos pacientes é fundamental, não devendo ser relatadas datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação não relevante ao caso, mas que eventualmente possa identificar o paciente. Os Relatos de Caso devem ter Resumo não estruturado com no máximo 150 palavras.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Relatos de Casos: Imagens em Medicina

Seção destinada à publicação de Imagens elucidativas, não usuais e/ou de amplo interesse de situações médicas. Deve conter até 500 palavras e um total de 5 referências. Duas a três imagens (resolução mínima de 300 dpi).

Cartas

Opiniões e comentários sobre artigo publicado na Revista, sobre temas de relevância científica e/ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser breve com, no máximo, 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas e, no máximo, cinco referências. Não devem ter resumo.

Comunicações Breves

Comunicações breves são resultados preliminares de pesquisas originais ou estudos mais pontuais que contêm todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar os seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante a artigos originais; no entanto, o resumo (Português, Espanhol ou Inglês) não deve exceder 150 palavras e o texto não deve exceder 1.200 palavras. Ter no máximo duas Tabelas ou Figuras.

Suplementos

Além dos números regulares, a CBR publica o suplemento da Semana Científica do HCPA.

CONFLITOS DE INTERESSE

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações pessoais ou financeiras que influenciam seu julgamento. Estas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis a um trabalho e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem informar sobre possíveis conflitos de interesse. Isso se estende para editoriais e artigos de revisão, e deve ser feito na ocasião do envio do manuscrito. Cabe ao editor decidir se esta informação deve ou não ser publicada e usá-la para tomar decisões editoriais. Uma forma comum de conflito de interesse é o financiamento de trabalhos de pesquisa por terceiros, que podem ser empresas, órgãos públicos ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados que a satisfaçam, tornando o estudo tendencioso. Autores devem descrever a interferência do financiador em qualquer etapa do estudo, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre patrocinador e autor. Os autores podem optar por informar nomes de pareceristas para os quais seu artigo não deva ser enviado, justificando-se.

PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE

Informações e imagens de pacientes que permitam sua identificação só devem ser publicadas com autorização formal e por escrito do paciente, e apenas quando necessárias ao objetivo do estudo. Para a autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e ter ciência de que este artigo poderá ser disponibilizado na internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificação de um paciente, como fotos com tarjas sobre os olhos, deve ser obtida a autorização formal. No caso de distorção de dados para evitar identificação, autores e editores devem assegurar-se de que tais distorções não comprometam os resultados do estudo.

EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS

Toda matéria relacionada com pesquisa em seres humanos e pesquisa em animais deve ter aprovação prévia de Comitê de Ética em Pesquisa ou Comissão de Ética no uso de animais, respectivamente. Os trabalhos deverão estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (vigente ou atualizada), das Resoluções CNS 196/96 e complementares e da Lei 11.794/2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comissão de Ética, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, se aplicável.

PREPARO DO ARTIGO

O cadastro no sistema e posterior acesso ou login são obrigatórios para submissão e verificação do estágio das submissões.

Identificação: devem constar: a) Título do artigo, que deve ser claro e conciso. Não usar abreviaturas. Deve-se apresentar a versão do título reduzido para constar no cabeçalho e título no idioma inglês; b) nome completo dos autores; c) instituição e o setor ou unidade da instituição a que cada autor está filiado (títulos pessoais e cargos ocupados não deverão ser indicados); d) nome da instituição onde o trabalho foi realizado; e) indicação do autor responsável pela correspondência, acompanhada do endereço completo; f) se tiver sido apresentado em reunião científica, deve-se indicar o nome do evento, o local e a data da realização.

TODOS OS NOMES DOS AUTORES INCLUÍDOS NO MANUSCRITO DEVEM SER CADASTRADOS NO SISTEMA

Resumo e Palavras-chave: os artigos devem conter o resumo em português e em inglês. Verificar a estrutura e o número máximo de palavras conforme descrito para cada tipo de artigo específico (ver anteriormente). Os resumos estruturados, exigidos apenas para os artigos originais, devem apresentar, no início de cada parágrafo, o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave, expressões que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de 3 a 10, fornecidas pelo autor, baseando-se no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma tradução do MeSH (*Medical Subject Headings*) da *National Library of Medicine*, disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>. As palavras-chave devem ser apresentadas em português e em inglês.

Manuscrito: deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Citações no texto e as referências citadas nas legendas das tabelas e das figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos. As referências devem ser citadas no texto sobrescritas, conforme o exemplo: Texto¹. texto¹⁻³, texto^{4,6,9}.

Tabelas: devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, mas deve-se evitar a duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser autoexplicativas. As abreviações devem ser especificadas como nota de rodapé sem indicação numérica. As

demais notas de rodapé deverão ser feitas em algarismos arábicos e sobrescritas.

Figuras e gráficos: as ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas em arquivos separados, em formato JPG (em alta resolução – no mínimo, 300 dpi). Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução e estarem no mesmo idioma do texto. Não serão aceitas fotocópias. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar a permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. As figuras devem possuir um título e legenda (se necessário). Ambos devem preceder a figura propriamente dita.

Abreviações: as abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. No restante do artigo, não é necessário repetir o nome por extenso.

Nome de medicamentos: deve-se usar o nome genérico.

Havendo citação de aparelhos/equipamentos: todos os aparelhos/equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

Agradecimentos: devem incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que tenham colaborado para a realização do estudo, mas cuja contribuição não justifique suas inclusões como autores; neste item devem ser incluídos também os agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc. Devem vir antes das referências bibliográficas.

Conflitos de interesse: Caso haja algum conflito de interesse (ver anteriormente) o mesmo deve ser declarado. Caso não haja, colocar nesta seção: “Os autores declaram não haver conflito de interesse”.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado “*Vancouver Style*”, conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela *List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine* e disponibilizados no endereço: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências e apenas citados no texto. Caso entendam necessário, os editores podem solicitar a apresentação de trabalhos não publicados citados no manuscrito.

Exemplos de citação de referências:

Artigos de periódicos (de um até seis autores)

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Artigos de periódicos (mais de seis autores)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

Artigos sem nome do autor

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

Livros no todo

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Capítulos de livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Livros em que editores (organizadores) são autores

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Teses

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Trabalhos apresentados em congressos

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland;1992. p. 1561-5.

Artigo de periódico em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>. Outros tipos de referência deverão seguir o documento International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Requisitos técnicos

Arquivo word (doc ou .rtf), digitado em espaço simples, fonte tamanho 10, margem de 2 cm de cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas e as imagens enviadas em formato jpg ou tiff com resolução mínima de 300dpi.