

HELENA AGUILAR PERES HOMEM DE MELLO DE SOUZA

**ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO BACTERIANA NA FIBROSE  
CÍSTICA COM ÊNFASE EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Libera Maria Dalla Costa

Co-orientador: Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho

CURITIBA

2005

A meus filhos,  
Renata, Fernanda e André,  
dedico não só este trabalho,  
mas todo o meu amor e minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A todas as pessoas que torceram por mim, me incentivando e encorajando durante este período difícil.

E a duas pessoas em particular, amigos de todas as horas: Carlos Augusto Albini e Gisele Pesquero Fernandes.

À minha orientadora e amiga, Libera Maria Dalla Costa, pelo companheirismo em boa parte da minha trajetória profissional.

À Coordenação do curso, na pessoa da professora Vanete Soccol, pela oportunidade da concretização deste desafio.

Aos colegas da Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas, por entenderem a minha ausência nas tarefas de rotina, em especial a Keite da Silva Nogueira, e por auxiliarem efetivamente na coleta dos dados deste trabalho.

A meus pais, pelo seu amor e incentivo desde antes de eu me conhecer por gente.

A meus filhos, Renata, Fernanda e André, razão maior da minha existência, por entenderem os momentos em que tive que me ausentar.

Ao Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba, pelo efetivo apoio financeiro à execução deste trabalho.

Ao Dr. Nelson A. Rosário, Dr. Carlos A. Riedi e Dr. Grégor P. Chermikoski Santos, por permitirem o acesso aos sujeitos da pesquisa, e pelas sugestões e conhecimentos compartilhados durante o estudo.

Aos responsáveis pelos pacientes, que concordaram em participar da amostragem.

À United Medical, na pessoa do Sr. Alberto O. Lopes, pelo apoio financeiro às pesquisas em fibrose cística desenvolvidas em nosso serviço.

À Newprov Produtos para Laboratório Ltda., pelo fornecimento de materiais emergenciais necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

A todos os que, indiretamente, colaboraram para a conclusão de mais esta etapa no meu processo de crescimento profissional.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	3
1.1.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	3
1.1.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA.....	4
2.1.1 Critérios diagnósticos tradicionais para FC clássica .....	5
2.1.2 Teste do suor .....	6
2.1.3 Condutividade .....	7
2.1.4 Diferença de potencial nasal .....	7
2.1.5 Dosagem de tripsina imunorreativa (TIR) .....	7
2.1.6 Análise das mutações .....	8
2.1.7 Triagem neonatal .....	8
2.2 GENÉTICA DA FIBROSE CÍSTICA.....	10
2.3 PATOGÊNESE DA FIBROSE CÍSTICA.....	12
2.4 EPIDEMIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA.....	14
2.5 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA.....	15
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
2.5.3 <i>Haemophilus influenzae</i> .....	21

2.5.4 Patógenos emergentes.....	22
2.5.4.1 <i>Burkholderia cepacia</i> .....	22
2.5.4.2. Micobactérias .....	24
2.5.4.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	24
2.5.4.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> & <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> .....	24
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES PULMONARES EM FIBROSE CÍSTICA.....	26
2.6.1 Coleta de amostras clínicas .....	26
2.6.2 Processamento das amostras para cultura .....	29
2.6.3 Testes de suscetibilidade a antimicrobianos .....	32
2.6.3.1 Método de disco-difusão .....	32
2.6.3.2 Métodos para testes de suscetibilidade por diluição .....	33
2.6.3.3 Detecção de resistência a oxacilina em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
2.6.4 Tipagem molecular de microrganismos .....	34
2.7 TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA FIBROSE CÍSTICA.....	39
2.8 PROGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA.....	45
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	47
3.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS .....	47
3.2 MÉTODOS .....	49
3.2.1 Semeadura das amostras .....	49
3.2.2 Identificação bacteriana .....	49
3.2.3 Teste de suscetibilidade .....	50
3.2.4 Criopreservação .....	51
3.2.5 Tipagem molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
3.2.6. Métodos estatísticos.....	52
4 RESULTADOS.....	53
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	78

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA.....	4
QUADRO 2 - SINAIS CLÍNICOS DA FIBROSE CÍSTICA.....	6
QUADRO 3 - SINAIS E SINTOMAS ASSOCIADOS COM EXACERBAÇÃO DA INFEÇÃO PULMONAR EM PACIENTES COM FC.....	43
QUADRO 4 - EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR <i>Staphylococcus aureus</i> .....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA TRIAGEM NEONATAL DA FC NO PARANÁ.....	9
FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PFGE.....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS X IDADE.....	41
GRÁFICO 2 - MÉDIA DOS INTERVALOS ENTRE AS COLETAS PARA CADA PACIENTE .....	48
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES POR SEXO EM CADA VISITA.....	53
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PERCENTIS DE PESO PELA IDADE EM MESES.....	54
GRÁFICO 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS PESO E PRESENÇA DE SINTOMAS.....	55
GRÁFICO 6 - PROPORÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> E <i>Haemophilus</i> spp NAS AMOSTRAS.....	56
GRÁFICO 7 - FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS POR IDADE.....	58
GRÁFICO 8 - INTERVALOS DE TEMPO EM QUE OS PACIENTES ESTIVERAM LIVRES DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE DE PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA AS BACTÉRIAS DE INTERESSE EM FC, POR PACIENTE.....	57
TABELA 2 - SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> E VALORES DE CIM <sub>50</sub> E CIM <sub>90</sub> DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta$ F508	- mutação por deleção de fenilalanina na posição 508 da proteína
°C	- graus centígrados
$\mu$ g/ml	- microgramas por mililitro
ACH	- ágar chocolate
AS	- ágar-sangue de carneiro
BCSA	- ágar seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	- proteína reguladora transmembrânica da fibrose cística
<i>CFTR</i>	- gene que codifica para a proteína CFTR
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIM <sub>50</sub>	- menor concentração que inibe 50% da população bacteriana
CIM <sub>90</sub>	- menor concentração que inibe 90% da população bacteriana
CNA	- ágar cistina-ácido nalidíxico
CO <sub>2</sub>	- dióxido de Carbono
DMSO	- dimetil-sulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucléico
EUA	- Estados Unidos da América
FC	- Fibrose Cística
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IgE	- imunoglobulina E
kb	- kilobases
LBA	- lavado bronco-alveolar
LEMC	- Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
MC	- ágar MacConkey
mEq/l	- miliequivalentes por litro
mg	- miligrama
mmol/l	- milimoles por litro
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSA	- ágar manitol-salgado
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NaCl	- cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	- nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (cátion)
NF	- não-fermentador
ng/ml	- nanogramas por mililitro
p. ex.	- por exemplo
PBS	- tampão salina-fosfato
PD	- diferença de potencial elétrico
PFGE	- <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em campo pulsado)
pH	- potencial hidrogênio-iônico
SCV	- <i>small-colony variants</i> (variantes colônias diminutas)
SDBP	- sem desenvolvimento de bactérias patogênicas
sp	- espécie
SP	- São Paulo
spp	- espécies
SXT	- sulfametoxazol-trimetoprim
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIR	- tripsina imuno-reativa
TSA	- ágar tríptico de soja
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
UFC/ml	- Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VanB	- gene de resistência à vancomicina de <i>Enterococcus</i> spp
VISA	- <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à Vancomicina

## RESUMO

A infecção pulmonar por *P. aeruginosa* é a principal causa de óbito dos pacientes com fibrose cística (FC), considerada a doença genética fatal mais freqüente na raça branca. Acredita-se que a colonização com *S. aureus* na primeira infância proporcione um ambiente favorável à instalação de *P. aeruginosa* nas vias aéreas dos indivíduos fibrocísticos. Foi idealizado um estudo longitudinal de 25 pacientes diagnosticados pelo programa de triagem neonatal para FC, visando acompanhar a evolução da colonização bacteriana do trato respiratório nos primeiros anos de vida. Foram coletadas culturas de orofaringe num total de 234 amostras (média de 9 por paciente), com intervalo médio entre as coletas de 53 dias, pelo período de um ano. As colônias de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus* spp. e *B. cepacia* foram identificadas e testadas quanto à sensibilidade a antibióticos pelo método de diluição em ágar, e os isolados de *S. aureus* foram submetidos a tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE). *S. aureus* foi a primeira bactéria a colonizar a orofaringe dos pacientes (média de 214 dias), e também em maior número de amostras (42%) do que *P. aeruginosa* (16%) e *Haemophilus* spp. (19%). Os isolados foram sensíveis a ciprofloxacino (73,5% dos isolados), eritromicina (68,6%), gentamicina (64,2%), oxacilina (75%), sulfametoxazol-trimetoprim (76,1%) e vancomicina (100%), sendo este último o agente mais ativo frente *S. aureus*. Os MRSA isolados apresentaram perfis eletroforéticos idênticos ao clone brasileiro identificado por Sader (1994). Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram-se não-mucóides e multissensíveis. Apesar do pequeno número de amostras e do tempo de acompanhamento limitado, pode-se verificar que os dados tendem a confirmar a literatura, ou seja, *S. aureus* e *Haemophilus* spp. se instalam precocemente nas vias aéreas dos pacientes FC, seguidos de cepas não-mucóides de *P. aeruginosa*.

## ABSTRACT

Pulmonary infection by *P. aeruginosa* is the major cause of death in patients with cystic fibrosis (CF), the most frequent genetic disease in Caucasian populations. It is believed that *S. aureus* airway colonization in infants with CF provides a favorable environment to *P. aeruginosa* installation. We performed a longitudinal study of 25 patients diagnosed by CF neonatal screening, in order to accompany the evolution of respiratory tract bacterial colonization in patients' first years of life. Two hundred and thirty three oropharynx cultures were collected (9 per patient on average), with a median interval of 53 days, for one year. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus* spp., *S. pneumoniae* and *B. cepacia* colonies were identified by standard methods and tested for antimicrobial susceptibility by agar dilution method. *S. aureus* isolates were molecularly typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *S. aureus* was shown to be the first bacterium to colonize the patients' oropharynx (after 214 days, on average), and in more samples (42%) than *P. aeruginosa* (16%) and *Haemophilus* spp. (19%). The isolates were sensible to ciprofloxacin (73,5% of isolates), erythromycin (68,6%), gentamicin (64,2%), sulfamethoxazole/trimethoprim (76,1%) and vancomycin (100%), vancomycin being the most effective against *S. aureus*. Methicillin-resistant isolates had PFGE profiles identical to Brazilian clone's results, identified by Sader (1994). *P. aeruginosa* isolates were non-mucoid and multisensible. Despite the small number of samples and the limited duration of the study, we could identify a tendency to confirm other reports, e.g., *S. aureus* and *Haemophilus* spp. colonize the CF patients airways earlier, followed by non-mucoid strains of *P. aeruginosa*.

## 1. INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é a doença genética fatal mais freqüente na raça branca. Por acometer especialmente indivíduos de ascendência européia, é relativamente freqüente no Sul do Brasil, devido à miscigenação étnica que ocorre em nossa população. A inclusão da pesquisa do defeito genético responsável pela doença no programa de triagem neonatal (teste do pezinho), em setembro de 2001, trouxe à tona diversos casos que provavelmente seriam diagnosticados após anos de tratamento sem sucesso de infecções pulmonares recorrentes. Além disto, aumentou consideravelmente o número de casos diagnosticados, a probabilidade de tratamento adequado e a sobrevida destes pacientes.

O uso de antibióticos profiláticos comprovadamente retarda a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, que é a bactéria mais comum na infecção brônquica que afeta cedo ou tarde todos os pacientes com FC. A causa de óbito nestes pacientes é, quase invariavelmente, a infecção e a inflamação provocadas por esta bactéria, e em alguns casos, também por *Burkholderia cepacia*. Alguns autores têm levantado a hipótese de que a infecção por *Staphylococcus aureus* proporciona um *milieu* favorável à aderência e à instalação de *Pseudomonas aeruginosa* nas vias aéreas dos pacientes com FC, e que a antibioticoprofilaxia dirigida a *Staphylococcus aureus* terminaria por retardar a colonização por aquela bactéria. Futuramente a continuidade deste estudo poderá fornecer subsídios para a verificação do papel de *Staphylococcus aureus* na patogênese da infecção pulmonar crônica dos pacientes diagnosticados pela triagem neonatal.

Até o presente momento, poucos estudos longitudinais foram realizados sobre a colonização e a dinâmica da infecção com *Staphylococcus aureus* em pacientes com FC. A fisiopatologia da infecção broncopulmonar e a conseqüente colonização e adaptação microbiana nos pulmões de pacientes com FC ainda não foram completamente compreendidas.

A incidência de casos de FC observados no Hospital de Clínicas da UFPR, e o constante isolamento de patógenos potenciais como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras respiratórias destes pacientes vêm intrigando os profissionais do Laboratório de Bacteriologia quanto à importância desses achados. Cerca de 50 pacientes já foram diagnosticados como portadores do defeito genético que provoca a doença, desde o início do programa de triagem neonatal, em 2001, e estão sendo acompanhados em ambulatório específico no Hospital de Clínicas da UFPR.

A colonização do trato respiratório das crianças portadoras de FC com *Staphylococcus aureus* logo na primeira infância vem sendo investigada há bastante tempo, sem que se tenha provado o papel que exerce na patogênese da infecção crônica que afeta estes pacientes.

Acredita-se que a infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* se instala geralmente nos pulmões já danificados pela infecção prolongada por outros agentes, especialmente *Staphylococcus aureus*, e acaba sendo responsável pela falência pulmonar e conseqüente óbito da grande maioria dos pacientes.

## 1.1. OBJETIVOS

**1.1.1. Objetivo principal:** observar a evolução da colonização bacteriana das vias aéreas de crianças com FC diagnosticadas através do programa de triagem neonatal, pelo período de um ano.

### 1.1.2. Objetivos secundários:

1. Documentar a evolução precoce da colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus* em crianças portadoras de FC na primeira infância, antes do aparecimento de sintomas de comprometimento respiratório característico da doença.
2. Estudar a frequência de isolamento de linhagens desses microrganismos em culturas seriadas de material de faringe posterior.
3. Estudar as características epidemiológicas da infecção por *Staphylococcus aureus* na população avaliada, através de técnicas de tipagem molecular.
4. Estudar a frequência de isolamento de patógenos menos comumente isolados, tais como: *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcalygenes xylosoxidans*.
5. Estudar a relação entre o aparecimento de sintomas respiratórios precoces e as alterações na microbiota das vias aéreas superiores.
6. Propor metodologias padronizadas para identificação e teste de suscetibilidade dos patógenos mais frequentes da população estudada.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA

O diagnóstico da FC nunca foi simples. Até 1930, a doença era reconhecida como uma síndrome clínica, mas as características não eram claramente distintas daquelas de outras causas de má absorção e retardo no crescimento, como a intolerância ao glúten (ou doença celíaca) (ANDERSEN, 1938). Em 1959 o desenvolvimento do teste do suor por iontoforese quantitativa com pilocarpina resolveu muitos dilemas diagnósticos. Atualmente este teste permanece clinicamente confiável, no entanto resultados falso-positivos e falso-negativos são freqüentemente detectados (WILMOTT, 1998).

Um consenso editado pela Fundação de Fibrose Cística dos Estados Unidos (Cystic Fibrosis Foundation), em 1998, propôs critérios atualizados para o diagnóstico da doença, embora os autores admitam que provavelmente não cubram todos os quadros clínicos possíveis. Para a grande maioria dos pacientes o diagnóstico é sugerido pela presença de uma ou mais características clínicas, história familiar de FC, ou resultado positivo de teste de triagem neonatal, o qual é confirmado por evidência laboratorial de disfunção do gene *CFTR* (QUADRO 1) (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998).

#### QUADRO 1. CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA.

Uma ou mais características fenotípicas - ou história familiar de FC - ou resultado de teste de triagem neonatal positivo <b>E</b> concentração aumentada de cloreto no suor por iontoforese com pilocarpina em duas ou mais ocasiões - ou identificação de duas mutações no gene <i>CFTR</i> - ou demonstração de transporte anormal de íons no epitélio nasal (diferença de potencial nasal)
---

FONTE: ROSENSTEIN, B. J.; CUTTING, G. R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. **J Pediatr**, v.132, n.4, Apr, p.589-95, 1998

A FC clássica pode ser diagnosticada ou excluída pelo teste do suor. Para alguns pacientes com poucos sintomas presentes, no entanto, testes mais extensivos são necessários para identificar variantes mais brandas. O diagnóstico da doença proporciona aconselhamento genético e vigilância pulmonar apropriada, o que pode se tornar cada vez mais importante à medida que os avanços terapêuticos melhoram o prognóstico (STERN, 1997).

### 2.1.1. Critérios diagnósticos tradicionais para FC clássica:

São considerados critérios diagnósticos tradicionais para a doença clássica: concentrações de eletrólitos persistentemente elevadas no suor, além de sinais clínicos característicos (doença gastrointestinal ou pulmonar típica e, talvez, azoospermia), ou história familiar.

Sempre que todos os rigorosos critérios tradicionais são contemplados, o diagnóstico de FC é considerado; no entanto, mesmo quando estes critérios não são verificados, a doença não pode ser completamente excluída. Para muitos pacientes com doença atípica, incluindo a maioria dos que são diagnosticados tardiamente na infância ou mesmo na idade adulta, o diagnóstico da FC se torna mais complicado (STERN, 1997).

Os sinais clínicos para o diagnóstico da FC estão listados no QUADRO 2. Além destes, história familiar ou resultado positivo na triagem neonatal podem ser informativos. O transporte anormal de íons é demonstrado pelas altas concentrações de cloreto e sódio no suor e por uma diferença de potencial elétrico elevada no epitélio nasal. Estas duas características podem ser usadas para o diagnóstico. Concentração de cloreto no suor maior que 60mmol/l em análises repetidas é diagnóstica de FC, embora 5% dos casos possam ser falso-negativos. O diagnóstico pode ser confirmado pela genotipagem das mutações mais comuns do gene *CFTR*, embora a gama de mutações possa variar de uma região geográfica para outra. A genotipagem do *CFTR* é também recomendada para pacientes com resultados duvidosos no teste do suor. Se este procedimento não for diagnóstico, um segundo teste de função do *CFTR* deve ser realizado, como a medida da diferença de potencial nasal ou a análise de amostras de biópsia da mucosa retal. Apesar de todos estes testes, alguns pacientes permanecem sem que um diagnóstico de certeza possa ser alcançado (RATJEN e DORING, 2003).

#### QUADRO 2. SINAIS CLÍNICOS DA FIBROSE CÍSTICA.

##### **Doença crônica das vias aéreas**

- Tosse crônica produtiva
- Colonização das vias aéreas com patógenos  
(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide)
- Anormalidades persistentes no raio X de tórax
- Obstrução das vias aéreas
- Baqueteamento digital, pansinusite, pólipos nasais

##### **Doença gastrointestinal**

- Íleo meconial, síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal
- Insuficiência pancreática, pancreatite, cirrose biliar
- Retardo do crescimento, edema com hipoproteinemia, deficiência de vitaminas lipossolúveis

##### **Síndrome de pseudo-Bartter (perda de sais com alcalose metabólica)**

##### **Infertilidade devido a azoospermia obstrutiva**

FONTE: RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. *Lancet*, v.361, n.9358, Feb 22, p.681-9, 2003

### **2.1.2. Teste do suor:**

O folclore suíço e austríaco já observava, em tempos medievais, que uma criança que tinha gosto salgado ao ser beijada era considerada enfeitiçada e morria precocemente. No entanto, somente em 1953, Paul di Sant'Agnese demonstrou o excesso de sal no suor de pacientes com FC (WILCKEN e WILEY, 2003). Ainda hoje, na maioria dos casos, o diagnóstico de FC será confirmado pela medida da concentração de cloreto no suor (ROSENSTEIN, 1998). O teste é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da FC, com elevadas sensibilidade e especificidade (>95%), baixo custo e a vantagem de não ser invasivo. Atualmente, o único método aceitável é o da iontoforese por pilocarpina, padronizado por Gibson e Cooke (1959). A quantidade de suor necessária é de no mínimo 100mg. O resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior que 60mEq/l. Os níveis considerados normais vão até 45mEq/l; adolescentes e adultos jovens podem ter valores mais elevados, e desta forma resultados entre 45 e 60 mEq/l são considerados duvidosos, devendo ser confirmados. Pela gravidade da doença e pelo seu prognóstico reservado, o diagnóstico de FC somente poderá ser firmado com dois testes positivos, realizados em momentos diferentes. Não existe correlação entre a concentração de íons no suor e a gravidade da doença (RIBEIRO, 2002).

### **2.1.3. Condutividade:**

A condutividade é um método alternativo e não-seletivo para a medida de íons no suor; está aumentada em pacientes com FC e sua quantificação foi proposta como teste diagnóstico. A Fundação para Fibrose Cística dos Estados Unidos (Cystic Fibrosis Foundation) aprovou um condutímetro especialmente desenhado para uso com o coletor de suor Wescor Macroduct, como método de triagem. Há excelente correlação entre os resultados das concentrações de cloro e a condutividade no suor. Um resultado de condutividade igual ou superior a 50mmol/l é considerado positivo e deveria ser confirmado por um teste do suor quantitativo (ROSENSTEIN, 1998).

### **2.1.4. Diferença de potencial nasal:**

O epitélio sinopulmonar, incluindo o epitélio nasal, regula a composição dos fluidos que banham a superfície das vias aéreas através do transporte de íons como o sódio e o cloreto. Este transporte ativo de íons gera uma diferença de potencial elétrico transepitelial (PD) que pode ser medido *in vivo*. As anormalidades no transporte de íons no epitélio respiratório de pacientes com FC estão associadas com um padrão diferenciado de PD comparando-se com epitélio normal, e isto permite o uso do PD nasal como um método auxiliar para o diagnóstico (ROSENSTEIN, 1998). O teste pode ser realizado em pacientes com poucas horas de vida, e estuda-se a sua utilização como padrão-ouro em substituição ao teste do suor (ALTON, 1990).

### **2.1.5. Dosagem de tripsina imuno-reativa (TIR):**

O aumento do tripsinogênio no sangue é secundário ao refluxo de secreção pancreática provocado pela obstrução dos ductos pancreáticos. O teste pode ser realizado com amostras de sangue impregnadas em papel-filtro especial, como na coleta para pesquisa de fenilcetonúria e hipotireoidismo. A dosagem da TIR é um indicador indireto da FC, pois avalia apenas a integridade da função pancreática. As proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos são relativamente elevadas. Apesar disso, o teste tem sido usado no Brasil como parte do “*teste do pezinho ampliado*”, portanto os médicos pediatras devem ser alertados sobre como interpretá-lo corretamente. Um teste com valores acima do padrão adotado, 70ng/ml, deverá ser repetido num intervalo de 15 a 30 dias, e se persistir positivo, o paciente deverá ser submetido ao teste do suor, para confirmar o diagnóstico de FC. Um teste negativo de TIR não exclui FC na ausência de insuficiência pancreática (RIBEIRO, 2002).

### **2.1.6. Análise das mutações:**

A identificação de duas mutações conhecidas confirma o diagnóstico de FC, sendo decisivo naquele paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor inconclusivo. A análise das mutações é de alto custo, e poucos centros no Brasil estão capacitados a realizá-la. A triagem das 25 mutações mais frequentes detecta 80 a 85% dos alelos de pacientes com FC. Dessa forma, a confirmação do diagnóstico pelo teste genético é extremamente específica, porém não muito sensível (RIBEIRO, 2002).

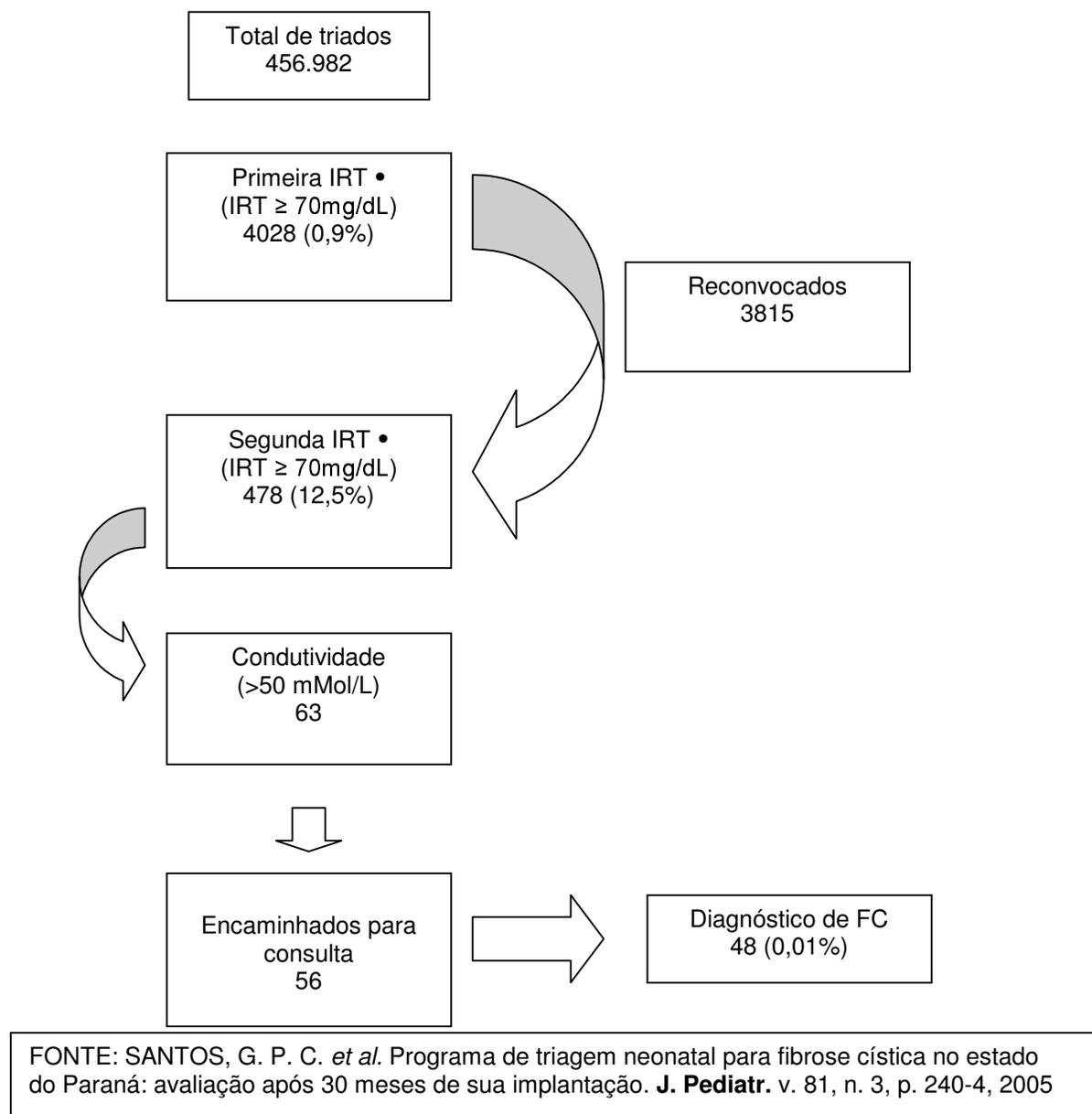
### **2.1.7. Triagem neonatal:**

Os programas modernos de triagem neonatal são baseados em duas etapas: primeiro, é realizado um teste para TIR em amostras de sangue fixadas em papel-filtro; depois os resultados positivos são confirmados por análise do DNA. Os resultados de um programa de triagem randomizado em Wisconsin, EUA, mostraram que o ganho de peso e altura precoces foi melhor nos pacientes diagnosticados pela triagem neonatal do que naqueles que não foram diagnosticados por este método. Por outro lado, o diagnóstico precoce pode expor os pacientes a patógenos da FC em centros especializados se não forem implementadas medidas de controle de infecção adequadas (RATJEN e DORING, 2003). A realização da triagem neonatal na população em geral permanece controversa, apesar do programa ter se tornado obrigatório no Brasil recentemente. Muitos especialistas não consideram justificável a triagem populacional, embora não restem dúvidas quanto à importância da triagem em famílias com história de FC (RIBEIRO, 2002).

O programa de triagem neonatal para FC implantado no Estado do Paraná foi uma iniciativa pioneira no Brasil. No período entre setembro de 2001 e abril de 2004 foram analisados aproximadamente 98% dos recém-nascidos (456.982), através do “teste do pezinho”, pela

dosagem de TIR por imunofluorimetria. Crianças com valores da TIR  $\geq 70$ ng/ml em duas amostras distintas, nos primeiros 30 dias de vida, foram submetidas à determinação da condutividade do suor pelo método de WESCOR; crianças com resultados maiores que 50mmol/l foram submetidos à dosagem quantitativa de cloro e/ou sódio no suor (iontoforese por pilocarpina). Ao final, 48 crianças (0,01% do total de triados) foram diagnosticadas com a doença, com uma incidência de 1:9520 nascidos vivos no Estado do Paraná (GRÁFICO 1) (SANTOS, 2005).

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DA TRIAGEM NEONATAL DA FC NO PARANÁ.



## 2.2. GENÉTICA DA FIBROSE CÍSTICA

O gene da FC localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no *locus* q31; é formado por 230 quilobases de DNA, com 27 *exons*, e tem a propriedade de codificar um RNA mensageiro de 6,5 quilobases, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora do transporte iônico, composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Também chamada de canal de cloro, é sintetizada no núcleo, sofre maturação em organelas citoplasmáticas (fosforilação e glicosilação), localizando-se na membrana apical das células. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de cloro, sódio e água (REIS, 1998). A CFTR é detectável somente na camada epitelial de certos órgãos (pâncreas, glândulas sudoríparas, ductos genitais masculinos, túbulos renais, pulmões, jejuno e cólon) (BARTH E PITT, 1998).

Mais de 1000 mutações naturais foram identificadas no gene *CFTR* até o momento, ocorrendo em todo o gene. Os fenótipos gerados por estas mutações variam em severidade; algumas mutações no *CFTR* apresentam um fenótipo completamente normal, enquanto outras causam FC severa afetando muitos sistemas orgânicos (LYCZAK, 2002). A mutação mundialmente mais comum é a de classe 2, causada por deleção de fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR ( $\Delta F508$ ) (RATJEN e DORING, 2003). Isto resulta em uma célula epitelial onde a proteína CFTR está ausente da membrana plasmática e, conseqüentemente, o transporte de cloro é deficiente. Independentemente da categoria da mutação, a anomalia no gene invariavelmente levará ao transporte anormal de íons através das superfícies epiteliais, e como conseqüência, à desidratação das secreções (BARTH E PITT, 1998).

Aproximadamente 70% dos cromossomos de pacientes com FC, no Norte da Europa, têm a mutação  $\Delta F508$ , cuja incidência diminui para o centro e Sul da Europa (RIBEIRO, 2002). No Brasil, a freqüência da mutação  $\Delta F508$  foi estudada em 190 pacientes FC caucasóides, de cinco diferentes Estados do Sul e do Sudeste, encontrando-se presente em 47% do total de alelos examinados. A freqüência por Estado variou bastante, sendo de 49% no Rio Grande do Sul, 27% em Santa Catarina, 44% no Paraná, 52% em São Paulo e 53% em Minas Gerais (RASKIN, 1993).

Das mais de 1000 mutações já identificadas, aproximadamente 20 ocorrem comumente em pacientes caucasianos. Outras mutações são mais raras, muitas sendo identificadas em um único paciente. Atualmente é possível detectar as mutações da CFTR mais comuns, e 85% a 90% dos portadores podem ser identificados, aumentando a possibilidade de uma triagem populacional (HUDSON e GUILL, 1998).

Tentativas de correlacionar mutações no *CFTR* com severidade da doença pulmonar não têm sido bem sucedidas. A ampla variação fenotípica em pacientes homocigotos para  $\Delta F508$ , e

diferenças na condutância de cloro entre gêmeos monozigotos e dizigotos, sugere que fatores ambientais, outros genes que não o *CFTR*, ou ambos, modificam o desenvolvimento, a progressão e a severidade da FC. Diversos fatores epigenéticos estão implicados no sistema imune; por exemplo, HLA-DR7, uma repetição AAT no intron do gene da sintase do óxido nítrico neuronal, e polimorfismos nos genes da  $\alpha_1$ -antitripsina e da lectina ligadora por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com FC (RATJEN e DORING, 2003).

### **2.3. PATOGÊNESE DA FIBROSE CÍSTICA**

A FC é basicamente um distúrbio difuso do transporte epitelial que afeta a secreção de líquido nas glândulas exócrinas e no revestimento epitelial dos tratos respiratório, gastrointestinal e reprodutivo. Em muitos lactentes, o distúrbio acarreta secreções mucosas anormalmente viscosas, que obstruem as vias orgânicas, resultando na maioria das manifestações clínicas da doença, como, por exemplo, infecções pulmonares recorrentes levando a doença pulmonar crônica, disfunção pancreática, esteatorréia, desnutrição, cirrose hepática, obstrução intestinal e infertilidade masculina. Essas manifestações podem aparecer em qualquer fase da vida, desde antes do nascimento a bem mais tarde na infância ou, mesmo, na adolescência (SCHOFIELD, 2000).

As alterações mais proeminentes são observadas nas vias aéreas, nas quais o defeito genético básico causa infecções pulmonares crônicas com surpreendentemente poucos patógenos

bacterianos. Diversas hipóteses tentam correlacionar as mutações no gene *CFTR* com o desenvolvimento dessas infecções, e a mais comentada atualmente é a da depleção de fluido isotônico/muco anóxico. Esta hipótese propõe que as concentrações isotônicas de sal são resultado da absorção anormal de sódio do lúmen das vias aéreas, conjugado à falha da proteína CFTR em secretar cloreto, produzindo um líquido periciliar com menor quantidade de água por volume. A perda de água aumenta a viscosidade do muco e dificulta o clearance mucociliar e o clearance da tosse. As bactérias que invadem o pulmão dos pacientes com FC são capturadas nesta camada de muco viscoso na superfície das células epiteliais respiratórias, onde encontram condições microaerófilas ou anaeróbicas de crescimento atribuídas ao consumo anormal de oxigênio pela célula fibrocística. Estas condições de crescimento desencadeiam uma mudança em *Pseudomonas aeruginosa* de células não-mucóides para mucóides, o principal fenótipo em pulmões fibrocísticos (WORLITZSCH, 2002).

Apesar desta e outras hipóteses serem discutíveis, uma característica aceitável da doença pulmonar na FC é uma resposta inflamatória exagerada, persistente e extensa a patógenos virais e bacterianos, caracterizada pela inflamação das vias aéreas dominada por neutrófilos. A inflamação está presente mesmo em pacientes clinicamente estáveis com alguma doença pulmonar e em crianças pequenas diagnosticadas pela triagem neonatal. A inflamação endobrônquica persistente é considerada deletéria para o curso da infecção pulmonar. A quantificação da inflamação nas vias aéreas é necessária para monitorar sua evolução ao longo do tempo e o efeito do tratamento anti-inflamatório. Esta monitoração ainda é uma tarefa difícil, uma vez que marcadores não-invasivos confiáveis da inflamação das vias aéreas não são disponíveis (RATJEN e DORING, 2003).

## 2.4. EPIDEMIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

A FC afeta principalmente a raça branca, de ascendência caucasiana, com aproximadamente uma em cada 25 pessoas albergando o gene anormal. A incidência da FC na população branca na maioria dos países é de cerca de um em cada 2000 nascidos vivos, com exceção de algumas regiões da Escandinávia onde a taxa é de um em 4.500. Esta frequência torna a FC a doença letal hereditária mais comum nas populações caucasianas. A doença também afeta populações hispânicas e negras, porém com uma taxa muito menor (BARTH E PITT, 1998). Em indivíduos do norte da Europa, a frequência do estado de portador é estimada em um para 25, e aproximadamente um em cada 2500 bebês nasce com FC. Uma análise recente de dados da população americana com FC indicou uma incidência de 1:3200 brancos, 1:15000 americanos de ascendência africana, 1:10900 índios americanos, 1:31000 americanos de ascendência asiática, e 1:9200 hispânicos (HUDSON e GUILL, 1998).

No Brasil, estima-se que a incidência da doença seja de 1:10000 nascidos vivos, embora haja variação na frequência das mutações em diferentes regiões geográficas, o que possivelmente refletiria também uma diferente prevalência da doença (RASKIN, 1993). No Estado do Paraná, o programa de triagem neonatal para a FC detectou, desde o seu início em setembro de 2001 até abril de 2004, uma incidência de 1:9520 nascidos vivos (SANTOS, 2005).

## 2.5. MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

A FC manifesta-se como uma síndrome clínica caracterizada principalmente por infecção respiratória crônica, além das anormalidades gastrointestinais e nutricionais típicas da doença. Enquanto o defeito genético responsável resulta em uma variedade de problemas clínicos para o paciente, a característica clínica mais proeminente, a infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*, permite que o processo patológico básico da FC seja considerado uma doença infecciosa. No estágio final da doença, 80 a 95% dos pacientes irão a óbito por falência respiratória devido a infecção bacteriana crônica e concomitante inflamação das vias aéreas (LYCZAK, 2002).

Uma grande variedade de espécies microbianas pode ser isolada de amostras respiratórias de pacientes com FC, no entanto é amplamente aceito que somente algumas poucas exercem papel importante na colonização ou infecção das vias aéreas. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* são os “patógenos clássicos” implicados na infecção pulmonar da FC. *Aspergillus fumigatus* e, mais recentemente, *Stenotrophomonas maltophilia*, também foram relatados como espécies com algum significado na doença. Alguns vírus, particularmente o vírus sincicial respiratório, podem ser pelo menos parcialmente responsáveis pela deterioração do pulmão em crianças pequenas com FC, especialmente nos estágios precoces da infecção respiratória (BARTH E PITT, 1998).

Muitos dos microrganismos isolados do escarro de pacientes com FC são patógenos que freqüentemente colonizam de forma benigna o trato respiratório superior, como *Haemophilus influenzae* não tipável, ou o nariz, como *Staphylococcus aureus*, ou então são organismos comuns do ambiente que se comportam como patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa*. Um dos principais questionamentos sobre os aspectos microbiológicos da infecção pulmonar da FC é sobre o significado da presença de um organismo potencialmente patogênico no escarro ou nas secreções do trato respiratório superior (LYCZAK, 2002).

### 2.5.1. *Staphylococcus aureus*:

*Staphylococcus aureus* é o patógeno inicial na colonização do trato respiratório na maioria dos pacientes de FC. Isto é evidente pelo fato de que, na primeira investigação clínica de FC em 1938, quando a média de sobrevivência era de 2 anos, todos os pacientes que sobreviviam além de uma semana acabavam morrendo devido a complicações pulmonares nas quais *Staphylococcus aureus* estava freqüentemente implicado (ANDERSEN, 1938). De fato, antes de 1950, a infecção por *Staphylococcus aureus* era a principal causa de falência respiratória em uma população que raramente atingia 10 anos de idade (BARTH E PITT, 1998).

A definição do papel de *Staphylococcus aureus* na doença pulmonar da FC é um assunto ainda não esclarecido. Este microrganismo é geralmente encontrado no nariz de indivíduos saudáveis, e não na garganta ou nas secreções respiratórias, embora seja considerado como um dos primeiros patógenos isolados do trato respiratório de pacientes de FC, geralmente de culturas de orofaringe. A presença de *Staphylococcus aureus* no trato respiratório inferior é claramente representativa de uma situação patológica, mas o grau de patologia associada com sua presença nos pulmões nunca foi adequadamente verificado em pacientes com FC (LYCZAK, 2002). Ulrich e colaboradores (1998) isolaram *Staphylococcus aureus* dos pulmões de três pacientes com FC infectados, e este microrganismo, bem como *Pseudomonas aeruginosa*, foi encontrado predominantemente no muco das vias aéreas obstruídas. Isto é claramente indicativo de uma situação patológica. O que não está inteiramente claro é a proporção de pacientes de FC com *Staphylococcus aureus* no trato respiratório inferior causando doença ativa. Uma provável razão para que isto não tenha sido adequadamente determinado é o fato de que antibióticos anti-estafilocócicos são rotineiramente usados nesta população de pacientes, para prevenir a progressão da infecção por *Staphylococcus aureus* a um estado altamente patológico que pudesse ser facilmente identificado clinicamente (LYCZAK, 2002).

Govan e colaboradores (1992) sugeriram que a infecção precoce por *Staphylococcus aureus* poderia “proteger” o trato respiratório inferior de infecções posteriores por *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo de Burns e colaboradores (2001) questionou se havia realmente uma transição de infecção por *Staphylococcus aureus* para *Pseudomonas aeruginosa*, pois os autores encontraram evidências de uma taxa de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* de 97,5% em crianças com até 3 anos de idade.

Os fatores específicos relacionados à infecção estafilocócica na FC são pouco entendidos. A viscosidade aumentada das secreções das vias aéreas e o clearance mucociliar alterado podem ter algum papel, mas não explicariam necessariamente a predileção seletiva de *Staphylococcus aureus*. Há evidências de que a aderência de cepas desta bactéria isoladas de pacientes de FC às linhagens de células epiteliais brônquicas é maior do que as de cepas não-FC. Além disso, cepas de *Staphylococcus aureus* de FC também foram relatadas ligando-se mais intensamente a células epiteliais escamosas nasais e bucais (SCHWAB, 1993). Estes resultados parecem indicar que podem haver cepas de *Staphylococcus aureus* com afinidade aumentada de adesão às células FC, ao invés das células FC terem receptores seletivos para *Staphylococcus aureus* (BARTH E PITT, 1998).

Além da aderência, *Staphylococcus aureus* possui uma variedade de outros fatores de virulência, tais como leucocidinas, catalase e proteína A que parecem permitir que a bactéria escape da resposta do hospedeiro à infecção; hemolisinas, coagulase e diversas toxinas são exemplos de substâncias que contribuem para a sua patogenicidade (COHEN, 1986).

Tem-se reconhecido por quase 20 anos que formas auxotróficas de *Staphylococcus aureus* são isoladas com frequência de pacientes de FC. Indivíduos portadores destas cepas auxotróficas geralmente receberam terapia anti-estafilocócica prolongada, especialmente sulfametoxazol-trimetoprim (SXT). Na literatura mais antiga, estes organismos eram descritos como cepas timidina-dependentes. A literatura mais recente descreve estes organismos auxotróficos como variantes “colônias pequenas” (*small-colony variants* - SCV). Estas bactérias crescem como colônias pequenas, não-hemolíticas, não-pigmentadas, de crescimento lento, em meios enriquecidos como ágar-sangue de carneiro ou ágar-chocolate, o que as torna difíceis de serem reconhecidas como *Staphylococcus aureus*. O meio seletivo ágar manitol-salgado permite o crescimento de *Staphylococcus aureus* auxotróficos e evita o crescimento concomitante de bacilos gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa* e o complexo *Burkholderia cepacia*. Este meio deve ser, portanto, utilizado para o isolamento de *Staphylococcus aureus* em culturas de todas as amostras respiratórias de pacientes com FC (MILLER e GILLIGAN, 2003).

Cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistentes (MRSA) estão sendo observadas com frequência aumentada em pacientes de FC. Aproximadamente 6% das cepas isoladas nos Estados Unidos são MRSA, com alguns centros relatando até 20%. Estudos epidemiológicos moleculares mostram que os pacientes de FC portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) freqüentemente adquirem a cepa quando são hospitalizados. Alguns pacientes tornam-se cronicamente infectados com estes organismos, enquanto outros podem ser infectados apenas transitoriamente (MILLER e GILLIGAN, 2003). Numa reunião de especialistas realizada em Londres em 1997 microbiologistas e clínicos revisaram as implicações da colonização ou infecção de pacientes com FC por MRSA. As conclusões a que chegaram foram as seguintes: (1) MRSA não parece aumentar a morbidade e mortalidade nos pacientes com FC, embora sejam necessários estudos futuros nesta área; (2) MRSA implica em dificuldades significativas quando os pacientes de FC estão sendo considerados para transplante, devido às conseqüências da infecção por MRSA em pacientes transplantados e a possibilidade de disseminação para outros pacientes nas unidades de terapia intensiva; (3) medidas especiais devem ser tomadas para a prevenção de infecções por MRSA em pacientes com FC, como a disponibilização de instalações especiais de isolamento nos centros de FC e vigilância regular dos portadores. Os pacientes de FC colonizados ou infectados por MRSA devem ser aconselhados a não comparecer a encontros sociais com outros pacientes de FC. O encontro por fim enfatizou a necessidade de comunicação efetiva com os pacientes de FC e seus familiares para diminuir a ansiedade característica que acompanha o achado de MRSA nas culturas de rotina (MRSA IN CYSTIC FIBROSIS, 1998).

### **2.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*:**

A infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* é a principal responsável pelo declínio progressivo da função pulmonar e finalmente pela mortalidade dos pacientes de FC. O dano à superfície epitelial e o bloqueio das vias aéreas, provocados pela bactéria, vão dificultando progressivamente a passagem do ar, o que resulta em diminuição da função pulmonar. A intensa inflamação caracterizada por seqüestro de neutrófilos nas vias aéreas contribui para o clearance mucociliar deficiente e formação de rolhas de muco (LYCZAK, 2002).

Os principais problemas clínicos para os pacientes de FC atualmente são, portanto, a infecção crônica das vias aéreas por *Pseudomonas aeruginosa* e a resposta inflamatória que a acompanha. Enquanto a quimioterapia e a quimioprofilaxia reduziram a morbidade e a mortalidade precoce dos pacientes de FC por esta infecção, a habilidade intrínseca deste microrganismo em desenvolver resistência a múltiplos antibióticos provavelmente responde pela incapacidade de erradicar *Pseudomonas aeruginosa* do pulmão dos pacientes. Na década passada, a contribuição proeminente da inflamação para a destruição tissular e perda da função pulmonar veio à tona em numerosos estudos. Terapias anti-inflamatórias passaram então a demonstrar melhora clínica nos pacientes infectados, embora com reações adversas preocupantes devido ao tratamento prolongado. Diversos estudos sugerem que a inflamação e a infecção bacteriana podem começar numa idade bem precoce, antes do aparecimento de sintomas (LYCZAK, 2002).

A incidência de *Pseudomonas aeruginosa* aumenta com a idade, e 70 a 90% dos pacientes serão eventualmente infectados. O curso da infecção crônica varia muito em cada paciente; alguns toleram o patógeno por 15 a 20 anos com pequeno declínio da função pulmonar, enquanto em outros a função piora rapidamente (REIS, 1998).

Colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa* indica um mau prognóstico. Os pacientes podem se infectar cronicamente em qualquer idade, porém o pior prognóstico está associado à infecção precoce, antes da puberdade. Em alguns casos têm sido detectadas infecções cruzadas, enquanto em outros o início da infecção crônica permanece obscuro. A duração da infecção pode variar de 9 meses a mais de 10 anos, com uma média de 3 a 4 anos antes do óbito. Em outro estudo, 20% dos pacientes cuja cronificação da infecção se estabeleceu nos primeiros 5 anos de vida, viveram até os 16 anos de idade, enquanto que naqueles em que a cronificação se deu após os 5 anos de idade, a sobrevida foi além dos 16 anos em 95% dos casos (REIS, 1998).

A presença de cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* sinaliza o começo da fase crônica da infecção. Esta fase é caracterizada por exacerbações pulmonares (febre, leucocitose, produção aumentada de escarro e diminuição da função pulmonar) que requerem terapia antimicrobiana. As exacerbações na FC são tipicamente entremeadas com períodos intermitentes de relativa quiescência, com cada fase durando períodos variados de tempo. No entanto a função

pulmonar continua a declinar, as cepas infectantes tornam-se cada vez mais resistentes, e o paciente inevitavelmente irá sucumbir à falência cardiorrespiratória (MILLER e GILLIGAN, 2003).

Há um consenso crescente de que a patologia pulmonar que ocorre durante a infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* é devida em grande parte à resposta imune dirigida contra biofilmes de *Pseudomonas*. Altos níveis de citocinas e proteases derivadas de leucócitos podem ser detectados no fluido das vias aéreas de pacientes com FC, e acredita-se serem responsáveis pela maior parte do dano pulmonar que ocorre nesta população de pacientes. A capacidade de *Pseudomonas aeruginosa* de crescer como um biofilme comprovadamente aumenta a resistência bacteriana à fagocitose e à antibioticoterapia. Além destes fatores, a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* é originada de outros atributos diversos da bactéria, como várias toxinas e fatores de secreção. Todas estas propriedades tornam este microrganismo extremamente resistente às defesas imunológicas inatas e adquiridas do hospedeiro (LYCZAK, 2002).

O isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* das secreções respiratórias de pacientes com FC é facilmente realizado, pois ambas formas, rugosas e mucóides, desenvolvem-se facilmente em meios seletivos para bacilos gram-negativos, tais como o ágar MacConkey e o ágar eosina-azul de metileno. A identificação presuntiva também é fácil, com base em um teste de oxidase positivo, produção de pigmento, crescimento a 42°C e, em alguns casos, morfologia colonial mucóide. Entretanto, conforme a infecção crônica progride, algumas cepas perdem a habilidade de produzir pigmentos bem como outras características fenotípicas. A perda destes fenótipos é muito provavelmente um processo evolutivo no qual os genes correspondentes são sub-regulados ou perdidos em um ambiente rico em nutrientes. Como resultado desta alteração evolutiva, pode-se tornar difícil identificar estas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com sistemas de identificação comerciais (SAIMAN, 2003).

O teste de suscetibilidade de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes de FC é área de alguma controvérsia. Múltiplos morfotipos podem ser isolados do escarro do paciente. Estudos que compararam a performance de testes de suscetibilidade de uma mistura de diferentes morfotipos com a performance de testes com cada morfotipo individualmente sugerem que testar morfotipos misturados pode subestimar resistência (THOMASSEN, 1979). Investigações recentes sugerem que uma variedade de sistemas comerciais, E-test<sup>®</sup>, e o método de disco-difusão funcionam bem comparados com o método de microdiluição em caldo, considerado como referência para determinação de suscetibilidade de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes de FC (BURNS, 2000).

O impacto de duas áreas importantes de investigação sobre a interpretação dos testes de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* ainda não foi estimado. A primeira delas é um estudo que sugere que a bactéria cresce em condições de anaerobiose dentro das vias aéreas dos pacientes de FC (WORLITZSCH, 2002). Se isto for verdade, os aminoglicosídeos não podem ser

ativos contra estes organismos, apesar dos resultados *in vitro*. Numerosos dados na literatura afirmam o contrário, que aminoglicosídeos administrados tanto por via intravenosa quanto na forma de aerossóis têm um impacto positivo na função pulmonar e na expectativa de vida dos pacientes de FC. No entanto, cepas que crescem em anaerobiose podem contribuir para a habilidade da bactéria de persistir nos pulmões dos pacientes de FC face às altas concentrações de aminoglicosídeos (MILLER e GILLIGAN, 2003).

A segunda área de investigação tem sido a determinação da forma microbiana de *Pseudomonas aeruginosa* que deveria ser usada para o teste de suscetibilidade. Recentemente foi desenvolvido um equipamento denominado “aparelho Calgary” que permite que o teste seja feito com cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* que crescem como biofilmes. Os resultados de suscetibilidade destas cepas foram comparados com os de cepas “planctônicas”, ou seja, as que normalmente são utilizadas nos testes rotineiros. As cepas de biofilmes foram significativamente mais resistentes a drogas anti-pseudomonas (AARON, 2002).

### **2.5.3. *Haemophilus influenzae*:**

A presença de *Haemophilus influenzae* é comum a todas as infecções respiratórias crônicas, e o seu papel patogênico na FC foi investigado em vários estudos. Rayner e colaboradores (1990) observaram que esta bactéria era isolada mais freqüentemente de pacientes com FC do que em pacientes com asma, e que o aumento na taxa de isolamento precedia o desenvolvimento de exacerbações agudas. Um estudo anterior mostrou que um aumento na proteína C-reativa, um marcador de inflamação, estava associado com exacerbação aguda em pacientes com altas contagens ( $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias - UFC/ml) de *Haemophilus influenzae* no escarro (GLASS, 1988). Uma revisão recente, entretanto, considerou que praticamente não existem dados relacionados ao potencial patogênico de *Haemophilus influenzae* não tipável, embora muitos clínicos considerem a possibilidade da colonização do pulmão por esta bactéria ser justificativa para instituir a terapêutica (LYCZAK, 2002).

### **2.5.4. Patógenos emergentes:**

Apesar da *Pseudomonas aeruginosa* permanecer como o patógeno pulmonar predominante nos pacientes de FC, recentemente emergiram diversos novos patógenos de relevância clínica para a doença. Uma característica provavelmente comum a todos estes patógenos raros é que eles podem colonizar e infectar pulmões de pacientes de FC que já foram extensivamente prejudicados por anos de infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* mucóide (LYCZAK, 2002).

**2.5.4.1. *Burkholderia cepacia*:** Nos anos 1980, cerca de 40% dos pacientes em alguns centros de FC estavam infectados com *Burkholderia cepacia*, uma bactéria multirresistente que frequentemente desaloja *Pseudomonas aeruginosa* previamente instalada. Ao invés de viverem com uma infecção persistente e prolongada por *Pseudomonas aeruginosa* por muitos anos, 20% dos pacientes infectados por *Burkholderia cepacia* morrem de infecção pulmonar progressiva depois de apenas poucos meses. As infecções por *Pseudomonas aeruginosa* não são altamente transmissíveis entre pacientes de FC; no entanto, a rapidez da aquisição de infecções por *Burkholderia cepacia* em alguns centros de FC parece indicar transmissão epidêmica, pessoa-a-pessoa. Diversos estudos epidemiológicos moleculares posteriores demonstraram este fato (HEARST e ELLIOTT, 1995). A bactéria é também capaz de invadir o epitélio das vias aéreas, uma provável explicação para a sua ampla resistência a antibióticos e sua capacidade de causar bacteriemia disseminada. Além disso, ela é intrinsecamente resistente a muitos antibióticos (LYCZAK, 2002).

A infecção por *Burkholderia cepacia* está associada com maior perda da função pulmonar quando comparada com a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, acarretando uma síndrome clínica caracterizada por febre alta, falência respiratória progressiva, leucocitose e velocidade de hemossedimentação elevada. Em certos centros, doentes infectados com *Burkholderia cepacia* têm apresentado pneumonia necrotizante grave, caracterizada por deterioração fulminante da função pulmonar; em outros, a infecção por *Burkholderia cepacia* não tem diferido daquelas observadas com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (REIS, 1998).

A infecção com o complexo *Burkholderia cepacia* pode ter conseqüências devastadoras para os pacientes de FC. Estes pacientes são excluídos de eventos sociais e conferências científicas para pacientes de FC e são rejeitados na triagem para potenciais receptores de transplante de pulmão em muitos centros de referência, devido aos resultados potencialmente negativos. É crucial, portanto, que a identificação laboratorial deste complexo de bactérias nas amostras de pacientes com FC seja a mais acurada possível (MILLER e GILLIGAN, 2003).

O isolamento do complexo *Burkholderia cepacia* de secreções respiratórias de pacientes FC tem melhorado com o uso de meios seletivos. Estes meios inibem o crescimento de outros patógenos potenciais para os pacientes com FC, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, que frequentemente crescem mais rapidamente e em maiores quantidades que os membros do complexo e portanto podem mascarar sua presença (MILLER e GILLIGAN, 2003).

Uma vez isolado, o complexo *Burkholderia cepacia* é de difícil identificação. Além do desafio de distinguir entre os genovares, deve ser feita diferenciação entre o complexo e outros organismos fenotipicamente similares, tais como *B. gladioli*, *Ralstonia* sp e *Pandoraea* spp. Apesar destes organismos terem sido isolados em culturas de amostras respiratórias de pacientes de FC,

até o momento nenhum estudo determinou o seu papel como patógenos pulmonares nesta população de pacientes (MILLER e GILLIGAN, 2003).

O complexo *Burkholderia cepacia* é comumente pan-resistente a agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas e aminoglicosídeos, portanto o tratamento é um desafio. Cepas isoladas após tratamento com múltiplos antibióticos são freqüentemente resistentes a todos os antimicrobianos conhecidos. A erradicação das infecções por estas bactérias é, portanto, difícil, quando não impossível, tornando crítica sua prevenção através de práticas agressivas de controle de infecção (MILLER e GILLIGAN, 2003).

**2.5.4.2. Micobactérias:** A prevalência das infecções por micobactérias em pacientes de FC varia muito entre os estudos, de aproximadamente 4% a quase 20%; no entanto, outros dados demonstram que não há aumento significativo na positividade do teste intradérmico em pacientes de FC comparados com pacientes controles não-FC. Além disso, um estudo recente tipo caso-controle retrospectivo não demonstrou efeito no prognóstico atribuível à infecção por micobactérias. Portanto, a importância clínica destas infecções permanece incerta (LYCZAK, 2002).

**2.5.4.3. *Aspergillus fumigatus*** é um patógeno fúngico que causa uma ampla variedade de doenças pulmonares, que não estão restritas a pacientes de FC, mas que estão relacionadas à imunossupressão. A colonização por este fungo pode resultar em infecção localizada ou disseminada e pode induzir uma resposta inflamatória aguda, bem como uma resposta granulomatosa crônica, ambas podendo levar à destruição do tecido pulmonar adjacente. Além disso, a aspergilose broncopulmonar alérgica, uma síndrome verificada em pacientes com asma e FC, é caracterizada por níveis séricos de IgE elevados, podendo levar a lesão de grandes vias aéreas (bronquiectasia central) (LYCZAK, 2002).

**2.5.4.4. *Stenotrophomonas maltophilia* & *Achromobacter xylosoxidans*:** As duas bactérias vêm aumentando sua freqüência, principalmente na população de FC adulta. No entanto, o papel de cada um destes agentes na doença pulmonar da FC ainda não foi estabelecido por estudos caso-controle, como foi feito com o complexo *Burkholderia cepacia*. A identificação de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter* spp isolados de amostras respiratórias de FC pode ser problemática. Diversos estudos demonstraram que ambas bactérias podem ser identificadas erroneamente pelos laboratórios clínicos como complexo *Burkholderia cepacia*, e vice-versa. A identificação é complicada parcialmente pelo crescimento de algumas cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter* spp em meios seletivos para *Burkholderia cepacia*. Assim como o complexo *Burkholderia cepacia*, ambas *Stenotrophomonas maltophilia* e

*Achromobacter* spp são freqüentemente resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos. O teste de suscetibilidade de *Stenotrophomonas maltophilia* deve ser feito através de um método por diluição, uma vez que erros muito importantes podem ser vistos quando realizado por disco-difusão usando os pontos de corte para *Pseudomonas aeruginosa*. Os clínicos que atendem pacientes de FC estão interessados em saber se estes microrganismos estão presentes, e em algumas situações clínicas, prescrevem terapia antimicrobiana para sua erradicação. (MILLER e GILLIGAN, 2003).

## 2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES PULMONARES EM FIBROSE CÍSTICA:

### 2.6.1. Coleta de amostras clínicas:

É difícil avaliar a bacteriologia do trato respiratório em lactentes e crianças pequenas incapazes de produzir escarro; entretanto, culturas de orofaringe frequentemente refletem a microbiota do trato respiratório inferior, e culturas de escarro predizem acuradamente a bactéria nos pulmões (THOMASSEN, 1984). Em pacientes jovens demais para expectorar, o único método não invasivo para cultivar secreções respiratórias é a obtenção de swabs de orofaringe (ARMSTRONG, 1996). Crianças muito pequenas com FC, particularmente antes do estabelecimento de infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, são usualmente incapazes de expectorar escarro derivado de secreções do trato respiratório inferior, e, portanto, culturas de orofaringe (isto é, secreções do trato respiratório superior) são usualmente processadas para detectar patógenos. Na realidade, estas culturas detectam organismos, inclusive os potencialmente patogênicos, presentes na garganta e não necessariamente nos pulmões (LYCZAK, 2002).

Durante a década passada, diversos estudos mostraram que podem haver diferenças importantes relacionadas à detecção de patógenos da FC nas vias aéreas inferiores, comparando os resultados de culturas de orofaringe com aqueles obtidos usando líquido de lavado broncoalveolar (LBA), particularmente em pacientes jovens com FC. Ramsey e colaboradores (1991) encontraram, em pacientes de FC não expectorantes e em bom estado respiratório, um alto valor preditivo positivo de culturas de orofaringe para a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas vias aéreas inferiores, determinadas por culturas de LBA, mas um baixo valor preditivo negativo; 46% dos pacientes não expectorantes mais jovens tinham *Pseudomonas aeruginosa* no líquido de LBA, mas uma cultura negativa de orofaringe. De maneira similar, 21% tinham *Klebsiella* spp no líquido de LBA, mas não na cultura de orofaringe. Ironicamente, o mesmo grupo relatou mais tarde dados opostos (BURNS, 2001): um alto valor preditivo negativo das culturas de orofaringe para presença de organismos nas vias aéreas inferiores, particularmente se duas culturas seqüenciais eram consideradas (85% para uma cultura, 97% para duas), e um baixo valor preditivo positivo (69% para uma, 83% para duas). Similarmente, para pacientes com FC menores de 5 anos, Rosenfeld e colaboradores (1999) relataram um valor preditivo negativo melhor (95%) de culturas de orofaringe com ausência de *Pseudomonas aeruginosa* para excluir a presença deste organismo nas vias aéreas inferiores, mas um baixo valor preditivo positivo para detectar sua presença no líquido de LBA. Armstrong e colaboradores (1996) obtiveram resultado similar em bebês com FC diagnosticados através de um programa de triagem

neonatal, com culturas de orofaringe tendo um alto valor preditivo negativo (97%) naqueles pacientes (para presença de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Haemophilus influenzae*), mas baixo valor preditivo positivo (41%). Portanto, alguns dados indicam que os patógenos da FC podem estar presentes nas vias aéreas inferiores, mas não são confiavelmente detectados por cultura de orofaringe, enquanto outros dados, principalmente de pacientes menores de cinco anos, sugerem que culturas de garganta positivas não são necessariamente indicativas de patógenos nos pulmões. Um lembrete importante é que as amostras de líquido de LBA são obtidas de somente uma pequena porção do pulmão, deixando a possibilidade dos patógenos estarem presentes em partes do pulmão não amostradas pela lavagem. Portanto, parece que os dados positivos de Ramsey, que mostraram detecção de patógenos no LBA em altas taxas, podem ser mais convincentes que os dados negativos dos outros grupos (LYCZAK, 2002).

Rosenfeld e colaboradores (1992) concluíram que as culturas de orofaringe em crianças muito jovens com FC possuem uma alta especificidade e valor preditivo negativo para *P.aeruginosa* no trato respiratório inferior, mas baixa sensibilidade e valor preditivo positivo. Portanto, nesta faixa etária, uma cultura negativa de orofaringe é útil para excluir infecção do trato respiratório inferior por *P.aeruginosa*; no entanto, uma cultura positiva não significa necessariamente presença de *P.aeruginosa* no trato respiratório inferior.

A especificidade e a sensibilidade das culturas de orofaringe do estudo de Rosenfeld (1992) são muito consistentes com os valores de ambos os estudos de Armstrong e Ramsey (1996). A utilidade clínica de uma cultura de orofaringe, no entanto, está relacionada ao seu valor preditivo mais do que às suas sensibilidade e especificidade. Os dois trabalhos anteriores chegaram a diferentes conclusões com respeito à utilidade clínica das culturas de orofaringe, devido às prevalências diferentes de organismos do trato respiratório inferior nas duas populações estudadas. A prevalência de *P.aeruginosa* nos bebês estudados por Armstrong era menor do que entre os indivíduos mais velhos estudados por Ramsey, ou seja, 11% *versus* 42%. As diferentes conclusões alcançadas por estes investigadores ilustram a importância de limitar as conclusões baseadas em valores preditivos a populações com prevalências similares de organismos (ROSENFELD, 1999).

Hudson e colaboradores (1993) avaliaram os achados bacteriológicos precoces em crianças com FC cujo diagnóstico foi feito antes dos dois anos de vida. Os autores concluíram que culturas de orofaringe com *Pseudomonas aeruginosa* precoce estavam associadas com significativo aumento da morbidade, e que a associação de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* resultava em significativo aumento na mortalidade, durante os primeiros dez anos depois do diagnóstico. Estes autores concluíram que pacientes com menos de dois anos de idade que tinham ambos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em uma amostra de orofaringe no momento do diagnóstico tinham estrutura pulmonar significativamente mais

desorganizada e maior evidência de inflamação no primeiro diagnóstico, além de taxas de morbidade e mortalidade significativamente maiores. Estes pacientes deveriam ser alvo de estudos controlados, com tentativas mais enérgicas para reduzir a infecção e a inflamação endobrônquicas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, profilaxia para infecção por estas bactérias, ou tratamento precoce destas infecções em pacientes jovens com FC, pode retardar o desenvolvimento de obstrução pulmonar (REIS, 1998).

Segundo o Grupo de Estudo de Antibióticos da Associação de Apoio a Pacientes com FC da Inglaterra (Cystic Fibrosis Trust), amostras adequadamente coletadas e processadas de secreções respiratórias são essenciais na determinação do uso apropriado de antibióticos. O material biológico a ser coletado dos pacientes que não conseguem expectorar deveria ser o swab profundo de orofaringe, também chamado “swab de tosse”, e uma amostra deveria ser obtida rotineiramente a cada visita clínica ou no início de exacerbações de doença respiratória. As crianças deveriam ser treinadas a partir da idade de dois anos para tossir quando o swab é colocado na orofaringe. Uma enfermeira ou fisioterapeuta experiente deveria coletar estas amostras, de preferência após uma sessão de fisioterapia.

Segundo este mesmo grupo de investigadores, os “swabs de tosse” são sensíveis quanto à detecção de infecção do trato respiratório inferior por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, mas algumas culturas são positivas quando a infecção está limitada às vias aéreas superiores. Infecções assintomáticas são comuns, particularmente em pacientes em bom estado respiratório, não cronicamente infectados por *Pseudomonas aeruginosa*. Os “swabs de tosse” são menos sensíveis e também não específicos na detecção de infecção respiratória inferior por *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, os autores consideram razoável tratar todos os pacientes dos quais são isolados patógenos potenciais, e que ainda não estão cronicamente infectados, com antibióticos adequados, independente de serem sintomáticos ou não (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

### **2.6.2. Processamento das amostras para cultura:**

O objetivo das culturas de amostras do trato respiratório de pacientes com FC é fornecer um método para isolamento dos microrganismos associados com doença pulmonar nestes pacientes. O número de espécies microbianas associadas com doença pulmonar na FC é relativamente limitado. A maioria dos autores enfatiza o isolamento destes microrganismos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide, *Staphylococcus aureus*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* e outros bacilos gram-negativos fermentadores ou não de glicose (GILLIGAN, 1991; SHREVE, 1999). Micobactérias, *Achromobacter xylosoxidans* e *Aspergillus* spp podem também exercer algum papel

na doença pulmonar da FC e deveriam ser pesquisados ativamente quando suspeitados (LYCZAK, 2002). Vírus respiratórios comuns, tais como o vírus sincicial respiratório em crianças e vírus influenza em todos os pacientes, podem também causar sintomas respiratórios e deveriam ser considerados durante períodos de atividade da doença na comunidade (GILLIGAN, 1991).

Wong e colaboradores (1984), possivelmente os primeiros autores a recomendarem o uso de meios seletivos para o isolamento de patógenos na FC, usaram meios seletivos juntamente com incubação aeróbica e anaeróbica para a quantificação de patógenos comuns em escarro liquefeito de crianças com FC. Os meios utilizados foram: ágar Cetrimide (Difco) para identificação de *Pseudomonas*; ágar MacConkey (Difco) para identificação de outros bacilos gram-negativos; ágar-sangue preparado adicionando 5% de sangue de carneiro estéril a ágar Trypticase Soy (TSA, BBL) (algumas placas foram suplementadas com gentamicina 10µg/ml e neomicina 25µg/ml para selecionar estreptococos); ágar Brain Heart Infusion modificado suplementado com L-histidina 10µg/ml, hemina 10µg/ml, NAD<sup>+</sup> 10µg/ml e bacitracina 250µg/ml para isolamento seletivo de *Haemophilus* spp; ágar manitol salgado e ágar dextrose-soy contendo cicloheximida 400µg/ml e cloranfenicol 50µg/ml para isolamento de leveduras.

Atualmente, os protocolos laboratoriais foram simplificados de forma a minimizar custos, levando em conta as idiossincrasias da microbiologia da FC (p. ex. populações polimicrobianas, presença de múltiplos morfotipos coloniais, diferenças na suscetibilidade a antimicrobianos dentro de uma única amostra) e a favorecer ao máximo os pacientes fornecendo informações microbiológicas úteis para facilitar o diagnóstico e a terapia anti-pseudomonas precoce nas exacerbações (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

A coloração de Gram é de pouca utilidade na avaliação de amostras de orofaringe, devido à freqüente ausência de sinais inflamatórios e à ampla e variada microbiota local. Um número limitado de microrganismos está associado à doença pulmonar na FC e sua presença na cultura é considerada clinicamente significativa independentemente dos achados da coloração de Gram, tanto em amostras de orofaringe como de escarro (GILLIGAN, 2004).

Os meios recomendados pela maioria dos autores para cultivo de amostras de orofaringe de pacientes de FC são os seguintes: ágar-sangue de carneiro ou de cavalo (AS); ágar-chocolate para isolamento de *Haemophilus influenzae* (ACH); ágar manitol salgado para isolamento de *Staphylococcus aureus* (MSA); ágar MacConkey para isolamento de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* (MC); ágar seletivo para isolamento de *Burkholderia cepacia* (BCSA) ou outro (GILLIGAN, 2004; CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002; ABMAN, 1991; ARMSTRONG, 1996; BURNS, 1998; GILLIGAN, 1991; HOIBY, 1982; HUDSON, 1993; RAMSEY, 1991; ROSENFELD, 1999).

Para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, o uso de MSA é indicado. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes não ocultarão o crescimento de *Staphylococcus aureus*

neste meio, como poderia acontecer em meios não seletivos ou em meios seletivos para gram-positivos tais como o ágar-sangue-cistina-ácido nalidíxico (CNA). Além disso, o MSA suporta facilmente o crescimento de *Staphylococcus aureus* SCV e aumenta o isolamento deste organismo. Para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* e outros bacilos gram-negativos fermentadores e não-fermentadores, o MC é adequado (GILLIGAN, 1991).

Para o isolamento de *Haemophilus influenzae*, Gilligan e colaboradores (1991) utilizaram o ágar-sangue de cavalo incubado em anaerobiose. Esta técnica, segundo os autores, tem diversas vantagens: (i) suprime o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* que pode mascarar o crescimento do *Haemophilus influenzae* quando incubado em aerobiose; (ii) os hemófilos hemolíticos podem ser facilmente distintos das espécies não-hemolíticas; (iii) ambos *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos do grupo A podem ser isolados com esta técnica, apesar de serem causas não usuais de exacerbação pulmonar em pacientes com FC (GILLIGAN, 1991).

Quanto ao isolamento de *Staphylococcus aureus*, Gilligan alerta que se deve ter atenção ao seguinte: (i) múltiplas cepas de *Staphylococcus aureus* podem estar presentes em uma amostra; deve-se alertar para diferenças sutis na morfologia colonial; (ii) em particular, cepas timidina-dependentes podem aparecer em pacientes tratados prolongadamente com SXT; estas cepas freqüentemente se apresentam como colônias um pouco menores, não-hemolíticas, mais chatas e mais cinzentas do que as cepas comuns; (iii) deve-se prestar bastante atenção à morfologia colonial dos estafilococos nos outros meios com sangue, bem como no MSA. Cepas de *Staphylococcus aureus* que não fermentam o manitol, ou que o fazem somente após muitos dias de incubação, têm sido isoladas de pacientes de FC (GILLIGAN, 2004).

Segundo o mesmo autor, o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia* e *Staphylococcus aureus*, independentemente da quantidade, é considerado clinicamente significativo, e a presença de qualquer destes três organismos em amostras de orofaringe deve ser relatada. Outros organismos tais como: fungos filamentosos, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e micobactérias de crescimento rápido, não devem ser relatados em culturas de orofaringe uma vez que podem ser considerados parte da microbiota orofaríngea (GILLIGAN, 2004).

### **2.6.3. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos:**

A natureza complexa da microbiologia da FC está refletida no longo debate sobre o valor dos testes de suscetibilidade dos patógenos da FC. Apenas recentemente o racional e o valor profilático da terapia anti-pseudomonas foram aceitos e amplamente praticados no Reino Unido e na Europa. A antibioticoterapia baseada nos resultados dos testes de rotina freqüentemente não implica em eficácia terapêutica. Uma explicação para esta discrepância é que, conforme a

colonização progride, surge considerável heterogeneidade, com diferentes morfotipos coloniais da mesma cepa, e mesmo morfotipos similares exibindo variações na sensibilidade. Portanto os testes *in vitro* baseados na análise de um único representante colonial podem não refletir as verdadeiras populações de *Pseudomonas aeruginosa* dentro do pulmão. Quando diferentes morfotipos coloniais do mesmo patógeno são isolados, um representante de cada morfotipo deve ser testado (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

#### **2.6.3.1. Método de disco-difusão:**

Este método para teste de suscetibilidade permite a classificação da maioria das cepas bacterianas como suscetíveis, intermediárias ou resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos. O método tem diversas vantagens: (i) é tecnicamente simples de fazer e muito reprodutível; (ii) os reagentes são relativamente baratos; (iii) não requer equipamentos especiais; (iv) fornece categorias de resultados de suscetibilidade facilmente compreensíveis para os clínicos, e (v) é flexível quanto à seleção de agentes antimicrobianos para teste.

O teste consiste na aplicação de um inóculo padronizado de bactérias (aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml) à superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Discos de papel-filtro impregnados com uma concentração fixa de antibióticos são colocados na superfície inoculada do ágar. As placas são incubadas por 16-18 horas em atmosfera ambiente a 35° C. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco de antibiótico são medidos em milímetros examinando-se a placa com luz refletida (JORGENSEN, 2003).

A primeira limitação do teste de disco-difusão é o espectro de organismos para os quais ele foi padronizado. Felizmente, as bactérias implicadas na doença pulmonar da FC encontram-se padronizadas para teste por este método, incluindo *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*. O teste em disco é inadequado para a detecção de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade intermediária a vancomicina (VISA) e foram relatadas dificuldades no passado na detecção de alguns estafilococos oxacilina-heterorresistentes e enterococos com resistência de baixo nível à vancomicina (tipo VanB). Uma desvantagem potencial do teste de disco-difusão é que ele fornece um resultado qualitativo, enquanto um resultado quantitativo indicando o grau de suscetibilidade (concentração inibitória mínima - CIM) pode ser útil em alguns casos selecionados, como as suscetibilidades de *Streptococcus pneumoniae* frente a penicilina e cefalosporinas (JORGENSEN, 2003).

#### **2.6.3.2. Métodos para testes de suscetibilidade por diluição:**

Estes métodos são usados para determinar a concentração mínima, usualmente em microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ) de um agente antimicrobiano, necessária para inibir ou matar um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são usualmente testados em diluições seriadas

múltiplas de dois, e a menor concentração que inibe o crescimento visível de um microrganismo é considerada a CIM. O método da diluição em ágar é uma técnica bem padronizada e confiável que pode ser usada como referência para avaliar a acurácia de outros sistemas de teste. Além disso, o teste simultâneo de um grande número de cepas com poucas drogas é eficiente, e a contaminação ou heterogeneidade microbiana é mais facilmente detectada nos métodos com ágar do que com caldo. As principais desvantagens do método em ágar estão associadas com o tempo e a carga de trabalho intensos necessários para preparar as placas, especialmente quando o número de agentes antimicrobianos a ser testado é grande, ou se somente algumas poucas cepas forem testadas (JORGENSEN, 2003).

#### **2.6.3.3. Detecção de resistência a oxacilina em *Staphylococcus aureus*:**

A detecção da resistência a oxacilina em cepas de *Staphylococcus aureus* tem sido dificultada devido à variabilidade nas técnicas padronizadas usadas para tal. As cepas resistentes são freqüentemente heterorresistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, de modo que duas subpopulações (uma suscetível e outra resistente) coexistem numa mesma cultura. Cada célula na população pode carregar a informação genética para resistência, mas somente uma pequena fração ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$ ) pode realmente expressar o fenótipo resistente sob condições de teste *in vitro*. A população resistente geralmente cresce muito mais devagar que a população suscetível e, portanto, pode não ser detectada quando é feito o teste *in vitro*. O sucesso da detecção das cepas heterorresistentes depende muito da promoção do crescimento das subpopulações resistentes, o que é favorecido por pH neutro, temperaturas mais baixas (30 a 35° C), presença de NaCl (2 a 4%), e possivelmente por incubação prolongada (até 48 horas) (SWENSON, 2003).

Estafilococos resistentes à oxacilina podem ser detectados utilizando-se uma placa de triagem com oxacilina. Uma quantidade padronizada de organismos (aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  UFC/ml) é preparada por suspensão direta das colônias crescidas em placa de ágar por uma noite e inoculada sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton contendo 6µg de oxacilina por ml e 4% de NaCl (SWENSON, 2001). Após incubação a 33-35° C (nunca acima de 35° C) por 24 horas, o aparecimento de qualquer crescimento indica que o amostra bacteriana é resistente à oxacilina e outras penicilinas penicilinase-resistentes (metecilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina) (BETHEL, 2004b).

#### **2.6.4. Tipagem molecular de microrganismos:**

Sabe-se, atualmente, que há suficiente diversidade genética entre as espécies bacterianas para permitir a identificação de diferentes clones. Um clone é definido como um conjunto de amostras bacterianas geneticamente relacionadas que são indistintas umas das outras por

métodos de tipagem molecular, ou amostras tão similares que presume-se serem derivadas de um ancestral comum (TENOVER, 1995).

Os métodos de tipagem microbiana podem ser enquadrados em duas grandes categorias: métodos **fenotípicos** e métodos **genotípicos**. Os métodos fenotípicos caracterizam os produtos da expressão genética a fim de diferenciar amostras bacterianas. Propriedades como perfis bioquímicos, tipos de bacteriófagos, antígenos presentes na superfície da célula e perfis de suscetibilidade a antimicrobianos são exemplos de propriedades fenotípicas que podem ser determinadas no laboratório. Devido a envolverem expressão genética, todas estas propriedades tendem a variar, com base em mudanças nas condições de crescimento, fase do crescimento, e mutação espontânea (TENOVER, 1997).

Os métodos genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética de um organismo e verificação dos polimorfismos nos padrões de restrição do DNA, de acordo com a clivagem do cromossomo por enzimas que clivam o DNA, e a presença ou ausência de DNA extracromossômico. Os métodos genotípicos são menos sujeitos a variação natural, apesar de poderem ser afetados por inserções ou deleções de DNA no cromossomo, por ganho ou perda de DNA extracromossômico, ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição por endonucleases (TENOVER, 1997).

Os sistemas de tipagem devem ser selecionados com base em sua utilidade no que diz respeito ao uso com o organismo-alvo, poder discriminatório, reprodutibilidade, e facilidade de interpretação e uso. O método escolhido deve ser baseado em uma característica do organismo-alvo que seja relativamente estável e que tenha diversidade adequada dentro da espécie (WESTBROOK, 2004).

Uma variedade de sistemas tem sido usada para tipagem de *Staphylococcus aureus*, tais como fagotipagem, sorotipagem de polissacarídeos capsulares, análise de proteínas, zimotipagem por análise de padrões de aloenzimas, ribotipagem e análise plasmidial. O sucesso da fagotipagem geralmente usada pode ser limitado pela baixa reprodutibilidade dos resultados e pela ocorrência de cepas de *Staphylococcus aureus* não tipáveis por este método. A tipagem plasmidial está limitada às cepas que carregam plasmídios, e as cepas podem trocar ou mesmo perder seu conteúdo plasmidial. Por outro lado, a zimotipagem provou ser um método de diferenciação de cepas estável e reprodutível. Além disso, as técnicas de genotipagem, isto é, caracterização do DNA cromossômico por ribotipagem ou eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) são úteis, já que foram usadas com sucesso para tipar várias bactérias (SCHLICHTING, 1993).

Os vários métodos utilizados para tipagem de *Staphylococcus aureus*, porém, não agrupam as amostras todos da mesma maneira. Alguns estudos têm avaliado e comparado diferentes métodos de tipagem, e tais estudos mostraram que as características fenotípicas como

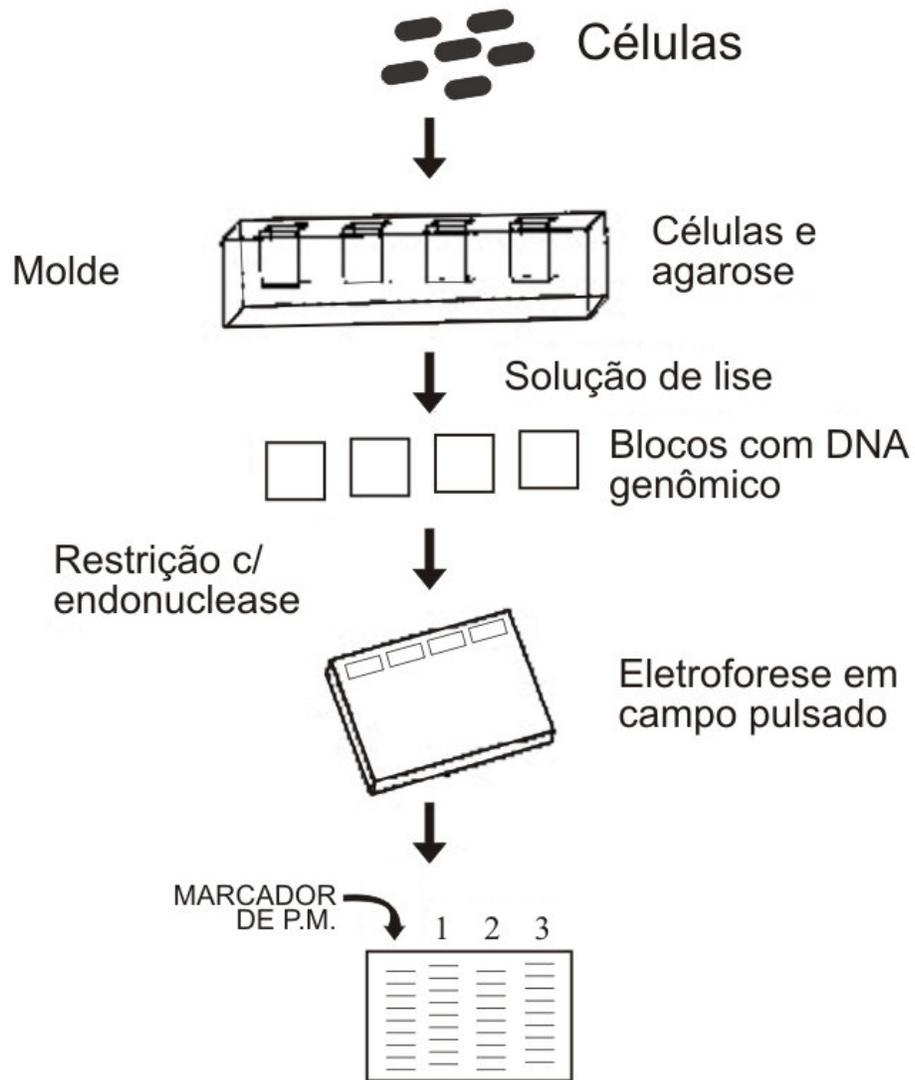
antibiograma, biotipagem e fagotipagem apresentam uma instabilidade maior do que os resultados das técnicas moleculares, como por exemplo, análise de plasmídeos, PFGE e perfil isoenzimático. Para a tipagem de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) é importante que a técnica utilizada apresente alto poder discriminatório, pois a maioria das cepas é derivada de um número pequeno de clones. Essa similaridade genética entre amostras de MRSA não relacionadas epidemiologicamente parece ser ainda mais acentuada no Brasil (SADER, 1995).

O sistema de tipagem recomendado para investigação de surtos de *Staphylococcus aureus* é o PFGE, que fornece resultados em 3 dias. Em comparação com outros métodos, o PFGE tem excelente aplicação quanto aos tipos de microrganismos que podem ser testados, e excelentes reprodutibilidade e poder discriminatório, embora seja um pouco difícil de executar e interpretar (WESTBROOK, 2004). Devido ao alto poder discriminatório, a PFGE tem sido recomendada por muitos pesquisadores como o método de escolha para a tipagem de MRSA (TENOVER, 1997).

A análise de fragmentos cromossômicos obtidos por restrição é baseada no fato de que os cromossomos não são estáticos e podem sofrer rearranjos e mutações-ponto. Alterações na seqüência de nucleotídeos são refletidas nos padrões de restrição por endonucleases do DNA cromossômico quando os fragmentos são separados em gel de agarose. A caracterização física do DNA bacteriano e fúngico tem sido limitada pela dificuldade na obtenção de fragmentos adequados de DNA devido à quebra mecânica de grandes moléculas de DNA em solução, e pela incapacidade da eletroforese em gel de agarose convencional de separar moléculas de DNA em tamanhos grandes (40 a 4.000 kb). Estas limitações foram contornadas pelo desenvolvimento de técnicas como a eletroforese em campo pulsado (PFGE), que permite que o DNA genômico total seja separado em um número limitado de fragmentos de restrição com distintas mobilidades eletroforéticas (FIGURA 1). O PFGE tem se demonstrado altamente efetivo em estudos epidemiológicos moleculares de cepas de bactérias e leveduras. O método foi desenvolvido em 1984 por Schwartz e Cantor, originalmente para células eucarióticas, e adaptado para uso em bactérias (SCHWARTZ e CANTOR, 1984).

Tenover e colaboradores propuseram um sistema para padronizar a interpretação dos padrões de PFGE com relação à determinação da correlação entre cepas. No seu esquema, as amostras bacterianas que geram o mesmo padrão de PFGE são consideradas a mesma cepa. Amostras bacterianas diferindo em um único evento genético, representado como uma diferença de uma a três bandas, são estreitamente relacionadas. Amostras diferindo de quatro a seis bandas, representando duas alterações genéticas independentes, são possivelmente relacionadas. Amostras bacterianas contendo seis ou mais bandas diferentes, representativas de três ou mais alterações genéticas, são consideradas não correlacionadas (TENOVER, 1995).

FIGURA 2. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PFGE.



FONTE: SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular Typing Methods. In: PERSING, D.H. *et al.* (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Wasington, DC: ASM Press, 1993, p.26-50

## 2.7. TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA FIBROSE CÍSTICA

O principal objetivo do tratamento de pacientes com FC é prevenir, erradicar ou controlar todos os tipos de infecção respiratória, particularmente as infecções endobrônquicas e pulmonares por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. Sem o tratamento antibiótico, as secreções respiratórias anormais da criança com FC tornam-se logo infectadas; a infecção e a inflamação endobrônquicas se estabelecem e eventualmente evoluem para a insuficiência respiratória fatal (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

Está bem estabelecido atualmente que vários esquemas de antibióticos orais, inalatórios e intravenosos podem prevenir, erradicar ou retardar a infecção crônica das vias aéreas inferiores. Mesmo quando a infecção já está instalada, o declínio da função respiratória pode ser retardado pelo tratamento antibiótico apropriado.

A introdução da triagem neonatal para a FC e o diagnóstico nas primeiras semanas de vida permitem a instalação precoce de medidas preventivas, monitoração microbiológica regular da presença de infecção respiratória, e tratamento antibiótico precoce. As infecções crônicas por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* uma vez estabelecidas são impossíveis de erradicar; mas, se tratadas precocemente, ambas bactérias são eliminadas com sucesso. (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

A melhoria das estratégias do tratamento antibiótico contra infecções respiratórias é considerada a principal razão do aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC, alcançado em relação às décadas passadas. A maioria dos pacientes é colonizada inicialmente com *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus influenzae*. Os clínicos geralmente concordam em tratar os pacientes com exacerbação pulmonar com antibióticos anti-estafilocócicos por 2 a 4 semanas. Muitos centros de referência em FC tentam erradicar a bactéria das vias aéreas dos pacientes com antibióticos orais mesmo na ausência de sintomas. Em pacientes com cultura positiva, o tratamento anti-estafilocócico por pelo menos 2 semanas leva a uma taxa de erradicação de cerca de 75%, e apenas uma pequena proporção de pacientes permanece com *Staphylococcus aureus* por mais de 6 meses após o tratamento (SZAFF e HOIBY, 1982). No entanto, esta bactéria pode persistir intracelularmente como colônias SCV (*small colony variants*), as quais algumas vezes não são detectadas nas culturas de rotina, podendo reverter para cepas normais com o término do tratamento antibiótico (KAHL, 1998).

Uma meta-análise publicada recentemente concluiu que a terapia anti-estafilocócica traz muitos benefícios aos pacientes com FC (MCCAFFERY, 1999). A terapia anti-estafilocócica com flucloxacilina instituída no momento do diagnóstico foi avaliada em um estudo controlado (WEAVER, 1994). O tratamento resultou numa diminuição do isolamento de *Staphylococcus*

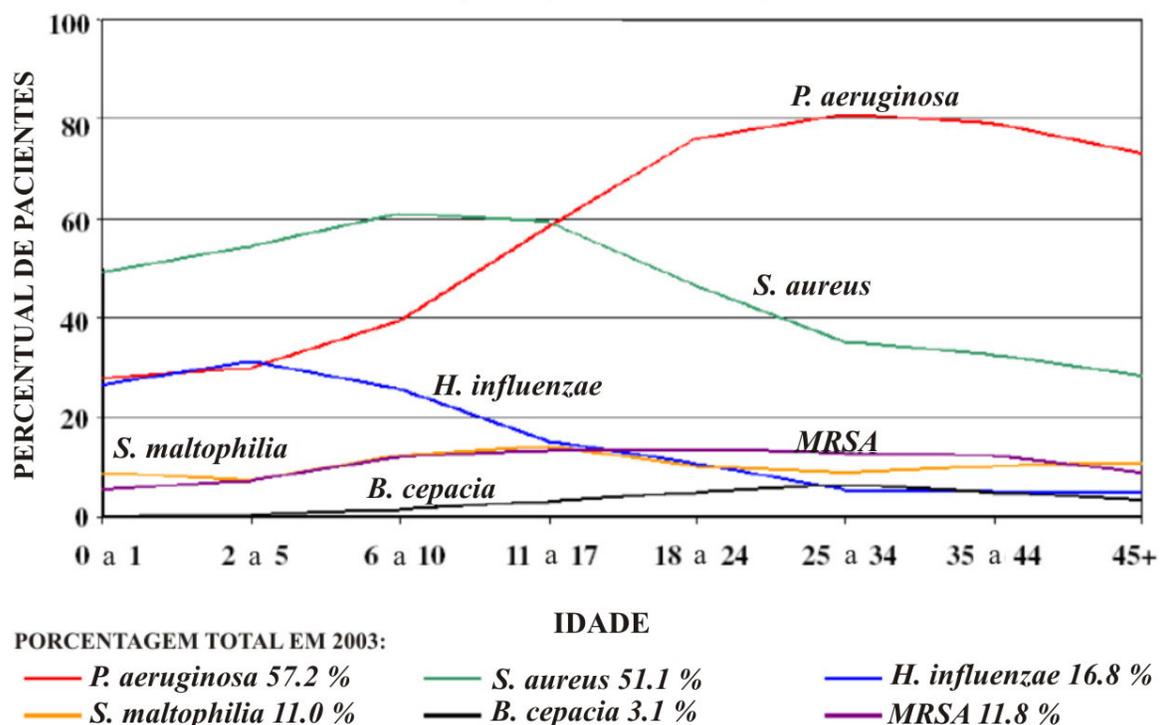
*aureus* nas culturas, diminuição da tosse e uma taxa menor de internamentos durante o período observado em relação aos que não foram tratados.

Apesar dos benefícios da erradicação precoce da colonização bacteriana das vias aéreas dos pacientes com FC serem bem conhecidos, em um estudo retrospectivo a terapia anti-estafilocócica contínua foi associada a uma taxa mais elevada de aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente nos primeiros 6 anos de vida (RATJEN, 2001). Do mesmo modo, em um estudo multicêntrico controlado por placebo do uso de cefalexina profilática desde o diagnóstico até a idade de 6 anos, os pesquisadores não encontraram nenhum benefício sobre a função pulmonar, tendo sido notada uma maior incidência de *Pseudomonas aeruginosa* nos pacientes tratados (STUTMAN, 2002). Até o momento não há evidências suficientes para julgar se os benefícios da terapia anti-estafilocócica profilática se sobrepõem aos riscos (RATJEN e DORING, 2003).

*Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) foi identificado pela primeira vez em 1960. Desde então tem sido ocasionalmente isolado de pacientes com FC, porém mais recentemente há evidências de aumento de prevalência, principalmente em pacientes pediátricos. Até o ano de 2001 ainda não havia consenso quanto ao melhor método de tratamento das infecções por MRSA nestes pacientes (MIALL, 2001). O tratamento de escolha para infecção por MRSA na população em geral é o uso de vancomicina intravenoso. O relato de um caso em que foi utilizado pela primeira vez vancomicina por via inalatória, em 1998, sugeriu que esta terapia poderia ser utilizada no tratamento de infecções respiratórias de pacientes com FC, com segurança, boa tolerância e baixa indução de resistência bacteriana (MAIZ, 1998).

Apesar da incidência de infecção por *Staphylococcus aureus* em pacientes com FC diminuir com a idade, a de *Pseudomonas aeruginosa* aumenta, tornando este microrganismo o principal patógeno nesta doença (GRÁFICO 2). Após um período inicial de colonização transitória com cepas não-mucóides, os pacientes não-tratados geralmente tornam-se cronicamente infectados por cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa*. Mesmo com esquemas antibióticos agressivos, esta modalidade da bactéria não pode ser erradicada, provavelmente devido à pouca penetração dos antibióticos nas rolas anaeróbicas de muco e ao rápido desenvolvimento de cepas mutantes, com resistência aumentada aos antibióticos (RATJEN e DORING, 2003).

#### GRÁFICO 1. INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS X IDADE



FORNE: CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry 2003 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, USA

A fim de prevenir o aparecimento de efeitos adversos e de obter altas concentrações nas vias aéreas, a via inalatória tem sido usada nas últimas duas décadas para o tratamento antibiótico de pacientes com FC. Tobramicina e colistina têm efeitos positivos na evolução clínica de pacientes com infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* (RATJEN e DORING, 2003). Uma meta-análise do uso contínuo de antibióticos inalatórios (gentamicina, tobramicina, colistina ou ceftazidima) concluiu que eles diminuem a carga bacteriana, a frequência de exacerbações respiratórias e o declínio da função pulmonar (MUKHOPADHYAY, 1996). Um estudo controlado de altas doses intermitentes de tobramicina livre de preservativos foi realizado com 520 pacientes nos Estados Unidos; ao final de três ciclos de tratamento os pacientes randomizados para receber tobramicina tiveram melhora da função respiratória de 10% comparada com 2% nos controles ( $p < 0,001$ ). A carga bacteriana no escarro dos pacientes tratados com tobramicina foi significativamente menor, e também a necessidade de internamentos e tratamentos com antibióticos intravenosos (RAMSEY, 1999).

O tratamento antimicrobiano precoce tem sido um avanço na luta contra a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* nos pacientes com FC. Na fase inicial da colonização com a bactéria, o uso de antimicrobianos pode evitar a mudança para infecção crônica mucóide. Têm

sido utilizadas para tratar a colonização precoce com *Pseudomonas aeruginosa* a combinação de colistina inalatória com ciprofloxacino oral, ou colistina inalatória ou tobramicina inalatória isoladamente. Diversos estudos têm demonstrado que estes esquemas reduzem a incidência de infecção crônica das vias aéreas nos pacientes com FC (RATJEN e DORING, 2003).

Os pacientes com FC apresentam exacerbações periódicas da infecção pulmonar que são identificadas primariamente com base em um aumento dos sintomas respiratórios e das secreções das vias aéreas (QUADRO 3) (RAMSEY, 1996). Um grupo de especialistas europeus recomendou a administração regular de antibióticos intravenosos a cada 3 meses, mesmo na ausência de sintomas, em pacientes cronicamente infectados; no entanto, ainda não foram realizados estudos controlados com poder suficiente para comparar esta estratégia de terapia de manutenção com a terapia de demanda (somente na presença de exacerbação pulmonar) (RATJEN e DORING, 2003).

QUADRO 3. SINAIS E SINTOMAS ASSOCIADOS COM EXACERBAÇÃO DA INFECÇÃO PULMONAR EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.

SINTOMAS	SINAIS
Aumento da frequência e duração da tosse	Aumento da frequência respiratória
Aumento da produção de escarro	Uso de musculatura acessória para a respiração
Alteração na aparência do escarro	Tiragem intercostal
Dificuldade respiratória	Alterações na ausculta pulmonar
Diminuição da tolerância ao exercício	Diminuições nas medidas da função pulmonar consistentes com doença obstrutiva das vias aéreas
Diminuição do apetite	Febre e leucocitose
Sensação de congestão torácica aumentada	Perda de peso
	Novo infiltrado na radiografia do tórax

FONTE: RAMSEY, B. W. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med**, v.335, n.3, Jul 18, p.179-88, 1996

O esquema antibiótico mais comum para o tratamento das exacerbações pulmonares da FC consiste de um aminoglicosídeo e um antibiótico beta-lactâmico ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*. A administração combinada destes tipos de drogas é indicada para retardar o surgimento de resistência. Devido ao volume de distribuição e ao clearance de antibióticos, freqüentemente elevados em pacientes com FC, as concentrações séricas de aminoglicosídeos necessitam de cuidadosa monitoração para atingir níveis terapêuticos. A emergência de espécies

resistentes a antibióticos, tais como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, levou alguns clínicos a não somente monitorar a suscetibilidade a antibióticos e o uso inapropriado de antibióticos orais e parenterais, mas também a iniciar estratégias específicas de controle de infecção (RAMSEY, 1996).

Em suma, a antibioticoterapia para pacientes com FC requer um acompanhamento especializado que considere as particularidades da microbiologia da doença. Durante a década passada houve uma melhora significativa da atividade antimicrobiana dos agentes anti-pseudomonas disponíveis e um crescente reconhecimento dos benefícios da terapia precoce e agressiva contra esta bactéria. Um dos avanços mais importantes foi a descoberta, a partir de pesquisas clínicas, de que a infecção por cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser reduzida ou retardada pelo tratamento precoce com colistina inalatória e ciprofloxacino oral ou tobramicina inalatória. O fundamento desta estratégia consiste no fato de que as infecções intratáveis por cepas mucóides e virulentas de *Pseudomonas aeruginosa* emergem como mutantes a partir de um reservatório de cepas não-mucóides. Com o tratamento precoce, estas cepas progenitoras podem ser reduzidas ou eliminadas, retardando ou até prevenindo o surgimento das variantes mucóides. Mesmo quando a terapia precoce falha na erradicação da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* mucóide, o uso de agentes como tobramicina, ceftazidime, ciprofloxacino e meropenem resulta em redução dos marcadores inflamatórios, melhora da função pulmonar e da sensação de bem-estar, associada a uma melhora da condição clínica. As hipóteses que podem explicar estes benefícios incluem a redução da carga bacteriana nos pulmões e a supressão da biossíntese de fatores de virulência, como o alginato, que é o principal determinante da virulência de *Pseudomonas aeruginosa* na FC (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002).

## 2.8. PROGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA

O prognóstico da FC relaciona-se com a herança genética, presença de insuficiência pancreática, sexo, idade de início e a gravidade das manifestações clínicas respiratórias. A presença da mutação  $\Delta F508$ , na forma homozigótica, relaciona-se com insuficiência pancreática, maior gravidade da doença pulmonar e colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* (RIBEIRO, 2002).

Com os avanços na terapêutica padronizada para pacientes com FC ao longo dos anos, a média de sobrevida aumentou espetacularmente. Enquanto na década de 1950 essencialmente todos os pacientes morriam até os 10 anos de idade, na década passada aproximadamente um terço dos pacientes com FC estava sobrevivendo até a idade adulta. Este aumento na média de sobrevida teve um impacto marcante na natureza da FC como doença infecciosa, uma vez que uma maior sobrevida dos pacientes com FC criou oportunidades para o estabelecimento de infecções por outras bactérias além de *Staphylococcus aureus*. Atualmente, *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno pulmonar mais prevalente nos pacientes com FC (LYCZAK, 2002).

Dados do registro de pacientes com FC dos Estados Unidos demonstram que a média de idade do óbito aumentou de 8,4 anos em 1969 para 14,3 anos em 1998, e a média de tempo de sobrevida aumentou de 14 anos em 1969 para 32 anos em 2000. Outros países têm também apresentado melhora destas taxas, embora persistam diferenças significativas na sobrevida. Estas diferenças podem ser afetadas por estratégias de tratamento, acesso a centros especializados e condição sócio-econômica (RATJEN e DORING, 2003).

Uma análise multivariada acompanhou a evolução de 127 pacientes em Minas Gerais por um período de 20 anos. Foi usado um modelo estatístico que permitia uma avaliação objetiva do risco de morte, e podia ser usado para aconselhamento da família do paciente. O estudo detectou um excesso de risco de morte nos pacientes com escore Shwachman abaixo de 70, idade ao diagnóstico menor que 3 anos e peso ao nascimento de menos de 3kg (OLIVEIRA, 2002). O “escore Schwachman” é um sistema de avaliação clínica de pacientes com FC baseado na atividade geral, exame físico, estado nutricional e dados radiográficos do pulmão. É dado a cada um dos quatro itens um peso igual (25 pontos), e um total de 100 pontos representa um escore “perfeito” (SHWACHMAN e KULCZYCKI, 1958).

O fator idade ao diagnóstico poderia ser especulado como peculiar em países em desenvolvimento como o Brasil, possivelmente devido a somente casos de FC com apresentação clínica severa serem acompanhados, enquanto casos moderados a leves, especialmente em áreas rurais, podem ser subdiagnosticados. A intensidade das anormalidades pulmonares varia muito e os casos mais severos procuram mais precocemente por diagnóstico e tratamento. O diagnóstico

tardio de casos clinicamente inaparentes ou menos severos não piora necessariamente o prognóstico (CAMARGOS, 2000).

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS:**

Foram coletados swabs de faringe posterior de crianças com FC, com diagnóstico de portadoras da doença pela triagem neonatal (teste do pezinho) e confirmação através do teste do suor. As coletas foram repetidas durante o período do estudo como parte do atendimento rotineiro do Ambulatório de Fibrose Cística de Recém-natos do Departamento de Pediatria do HC-UFPR. A frequência das coletas obedeceu aos intervalos de atendimento estabelecidos por aquele ambulatório, de acordo com a evolução clínica de cada paciente; desta forma, o intervalo entre as coletas variou de 15 dias a três meses, com média de 53 dias (GRÁFICO 3). O material biológico para avaliação da microbiota colonizadora da orofaringe foi coletado em todas as consultas, totalizando 234 amostras, com uma média aproximada de nove amostras por paciente.

Foram incluídos no estudo todos os pacientes atendidos regularmente no Ambulatório de Fibrose Cística de Recém-Natos do Departamento de Pediatria pelo período de um ano, com início em 25 de agosto de 2003 e término em 6 de dezembro de 2004, totalizando 25 pacientes.

Foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelo responsável legal pelo paciente, no momento da coleta da primeira amostra do material biológico (ANEXO 1). Os responsáveis pelos pacientes foram devidamente esclarecidos quanto à natureza do estudo e os possíveis benefícios advindos da pesquisa. Foi detalhado o procedimento de coleta do material biológico e assegurada a ausência de riscos ao sujeito (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

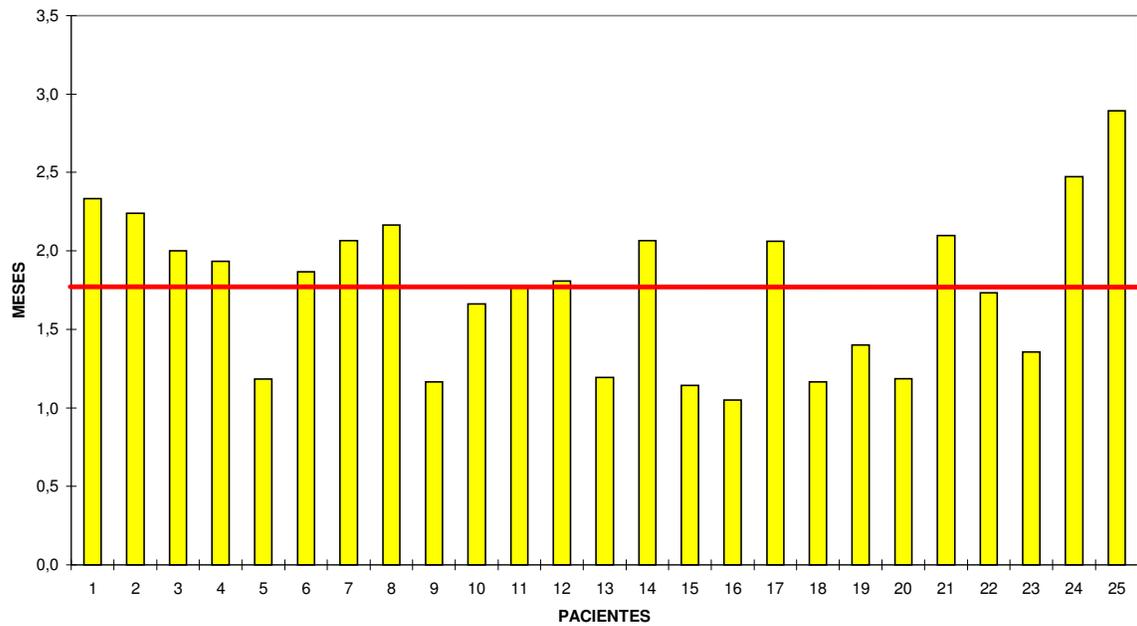
Foi preenchida a ficha clínica (ANEXO 2) imediatamente após a consulta, de acordo com os dados registrados pelo médico no prontuário de cada paciente.

O material biológico (swab) foi transportado em tubos contendo 1 ml de tampão PBS com 0,1% de gelatina bacteriológica, em caixa de isopor (RAMSEY, 1991).

Na chegada do material ao laboratório, foi registrada a sua entrada no sistema informatizado do Hospital de Clínicas e cada amostra foi homogeneizada em agitador elétrico tipo vórtex por 30 segundos.

GRÁFICO 2. MÉDIA DOS INTERVALOS ENTRE AS COLETAS PARA CADA PACIENTE.

### MÉDIA INTERVALO DE VISITAS



## 3.2. MÉTODOS:

### 3.2.1. Semeadura das amostras:

A suspensão homogeneizada da amostra foi inoculada com alça calibrada de 10 microlitros (0,01ml) em três placas com diferentes meios de cultura, a saber: ágar-sangue (AS), ágar chocolate suplementado (ACH) e ágar MacConkey (MC), de maneira a propiciar avaliação semi-

quantitativa do crescimento bacteriano (KONEMAN, 2001). As placas foram incubadas a 35 – 36° C por 24 horas em atmosfera normal para as placas de AS, por até 72 horas em atmosfera normal para as placas de MC e em jarra sob tensão a 5 – 10% de CO<sub>2</sub> por 48 horas para as placas de ACH.

### 3.2.2. Identificação bacteriana:

As bactérias isoladas em quantidades significativas (acima de 20 UFC) ou em qualquer quantidade para as colônias suspeitas das bactérias classicamente isoladas nesta população de pacientes, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* (ANEXO 3) foram consideradas significativas. As colônias suspeitas desenvolvidas nos meios de cultura inoculados foram identificadas utilizando os métodos de rotina da Seção de Bacteriologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, que por sua vez se baseiam em literatura atualizada (MURRAY, 2003; YORK, 2004).

Para a identificação de *Staphylococcus aureus*, as colônias suspeitas nas placas de AS e ACH (médias, brancas ou levemente douradas, lisas, com bordos inteiros, levemente elevadas e hemolíticas) foram submetidas às provas da catalase e da coagulase livre (em lâmina), e os resultados desta foram confirmados pela prova da coagulase ligada (em tubo). Posteriormente foram realizados testes confirmatórios para a identificação definitiva de *Staphylococcus aureus*, após reativação das amostras armazenadas, a saber: hemólise em ágar-sangue de carneiro, prova da coagulase ligada, crescimento em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio (meio de Chapman), fermentação do manitol (em ágar contendo o açúcar e vermelho de fenol), pigmentação das colônias e atividade da desoxirribonuclease (em ágar DNase), utilizando as técnicas preconizadas na 8ª edição do Manual de Microbiologia Clínica da Sociedade Americana de Microbiologia (BANNERMAN, 2003).

Para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, as colônias lactose-negativas e com odor característico na placa de ágar MacConkey foram submetidas à prova da oxidase. Em caso positivo, a confirmação da espécie em questão foi realizada através das provas de fermentação ou oxidação da glicose, produção de piocianina em ágar Pseudomonas P, motilidade, redução de nitrato, liquefação da gelatina, hidrólise da arginina, utilização de acetamida e crescimento em ágar cetrimide a 35 e 42° C (KISKA, 2003).

Para a identificação de *Haemophilus influenzae*, as colônias suspeitas e com odor característico na placa de ágar chocolate suplementado (médias a grandes, acinzentadas, semi-opacas, lisas, ligeiramente chatas e convexas) foram submetidas às provas do satelitismo e do requerimento de fatores de crescimento específicos (X e V) (KILIAN, 2003).

Para a identificação de bacilos gram-negativos não-fermentadores, as colônias suspeitas no ágar MC foram submetidas às provas iniciais de identificação desta classe de microrganismos, como: oxidase, fermentação da glicose, motilidade, hemólise em ágar-sangue de carneiro e crescimento a 44° C. Quando necessário, provas complementares foram realizadas, de acordo com Screckenberger (2000).

### **3.2.3. Teste de suscetibilidade:**

Foi realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método clássico de disco-difusão (Kirby-Bauer) das bactérias pesquisadas neste estudo ou de outras, desde que em quantidades significativas (MUNRO, 2004).

Foi realizado antibiograma pelo método de Kirby-Bauer de todas as amostras de *Staphylococcus aureus* frente aos seguintes antimicrobianos: cefoxitina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, e vancomicina. Foi realizado teste de triagem para resistência à oxacilina de todas as amostras pelo método da placa de triagem com aquele antibiótico, e teste de suscetibilidade por concentração inibitória mínima de todas as amostras de *Staphylococcus aureus* armazenadas, pelo método de diluição em ágar, frente a diferentes concentrações dos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, SXT e vancomicina (ANEXO 5).

Para *Haemophilus influenzae* foi realizada pesquisa de beta-lactamase pelo método do disco com cefalosporina cromogênica (Nitrocefim®). Este método é o mais indicado para os testes diretos de rotina laboratorial para prever resistência ou suscetibilidade de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Neisseria gonorrhoeae* a penicilina, ampicilina e amoxicilina. As colônias sob teste são friccionadas sobre um disco de Nitrocefim® umedecido com água destilada esterilizada, e a leitura realizada em até 5 minutos. O aparecimento de coloração vermelha no local confirma a produção de beta-lactamase pela bactéria testada (BETHEL, 2004a).

Cada morfotipo diferente de *Pseudomonas aeruginosa* foi testado separadamente pelo método de Kirby-Bauer e a interpretação realizada após 24 horas completas de incubação (THOMASSEN, 1979). As demais bactérias isoladas foram testadas pelo método tradicional (Kirby-Bauer), ou pelo método automatizado (Vitek – BioMérieux), de acordo com a rotina do serviço.

Os resultados das culturas e dos testes de suscetibilidade foram liberados através do sistema informatizado do Hospital de Clínicas, para acesso aos médicos do Ambulatório requisitante, com base nos dados anotados no formulário de cultura de orofaringe (ANEXO 4).

### **3.2.4. Criopreservação:**

As amostras bacterianas de interesse foram suspensas em solução para criopreservação e armazenadas a - 80° C para testes complementares a serem realizados em conjunto, posteriormente. Os organismos foram preparados para o congelamento por inoculação em placas de ágar-sangue e incubação até a fase estacionária de crescimento. As colônias desenvolvidas na superfície do ágar foram recolhidas com alça esterilizada e transferidas diretamente para um criotubo com caldo infuso de cérebro e coração adicionado de 15% de glicerol e emulsionadas até uma suspensão final densa. Para a melhor preservação de estreptococos e hemófilos foi acrescentado sangue de carneiro à solução de criopreservação. (REIMER, 2003).

### **3.2.5. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus*:**

As 65 amostras de *Staphylococcus aureus* armazenadas foram caracterizadas molecularmente através da análise dos fragmentos obtidos por restrição do DNA cromossômico por PFGE (ANEXO 6) (SILBERT, 2000). Amostras bacterianas obtidas de um mesmo paciente em datas muito próximas não foram encaminhadas para a análise molecular, devido ao alto custo deste procedimento, e à grande probabilidade de se tratarem das mesmas cepas obtidas na coleta anterior. A interpretação dos perfis de PFGE para análise de similaridade das amostras bacterianas seguiu os critérios recomendados por Tenover e colaboradores (TENOVER, 1995).

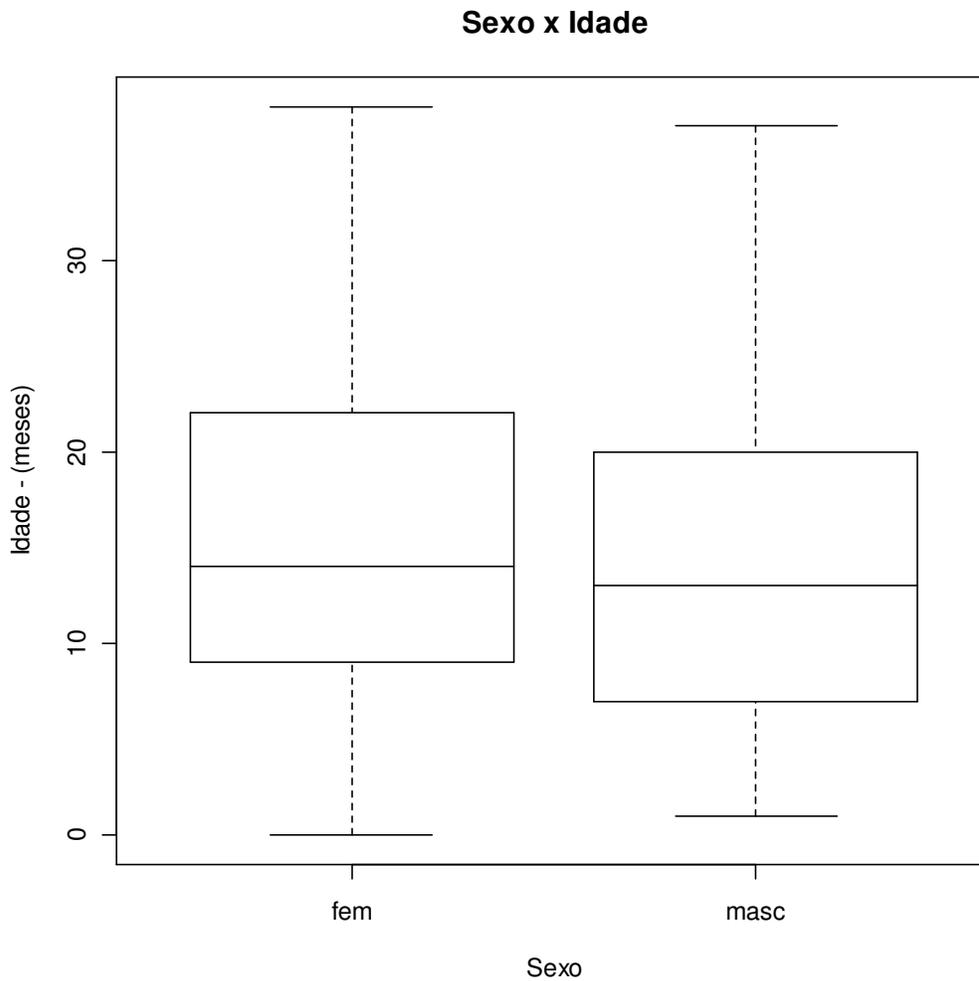
### **3.2.6. Métodos estatísticos:**

Foi utilizada análise descritiva dos dados, para observação do que ocorria com as amostras, e apresentação em forma de tabelas, gráficos ou simplesmente de modo descritivo. Em algumas situações utilizou-se o teste "t", o teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Também foram calculados os Intervalos de confiança para proporções (THE R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2003; SOARES, 1995; GIOLO, 2003).

#### 4. RESULTADOS

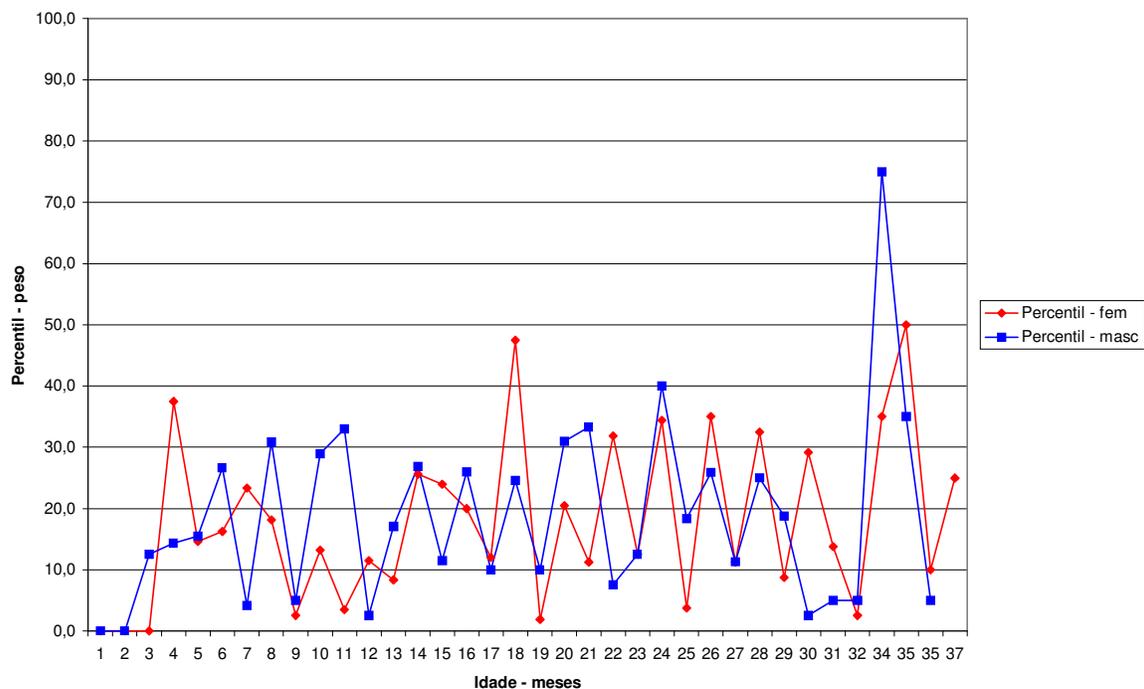
Foram coletadas 234 amostras de orofaringe de um total de 25 crianças no período de 25 de agosto de 2003 a 6 de dezembro de 2004, numa média de 9,3 amostras por paciente. A distribuição dos pacientes quanto ao sexo foi de 48% do sexo masculino e 52% do sexo feminino; os pacientes analisados tinham uma média de idade de 14,3 meses para os meninos e 15,5 meses para as meninas, com uma média nas diferentes coletas de 15 meses (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 3. DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES POR SEXO EM CADA VISITA.



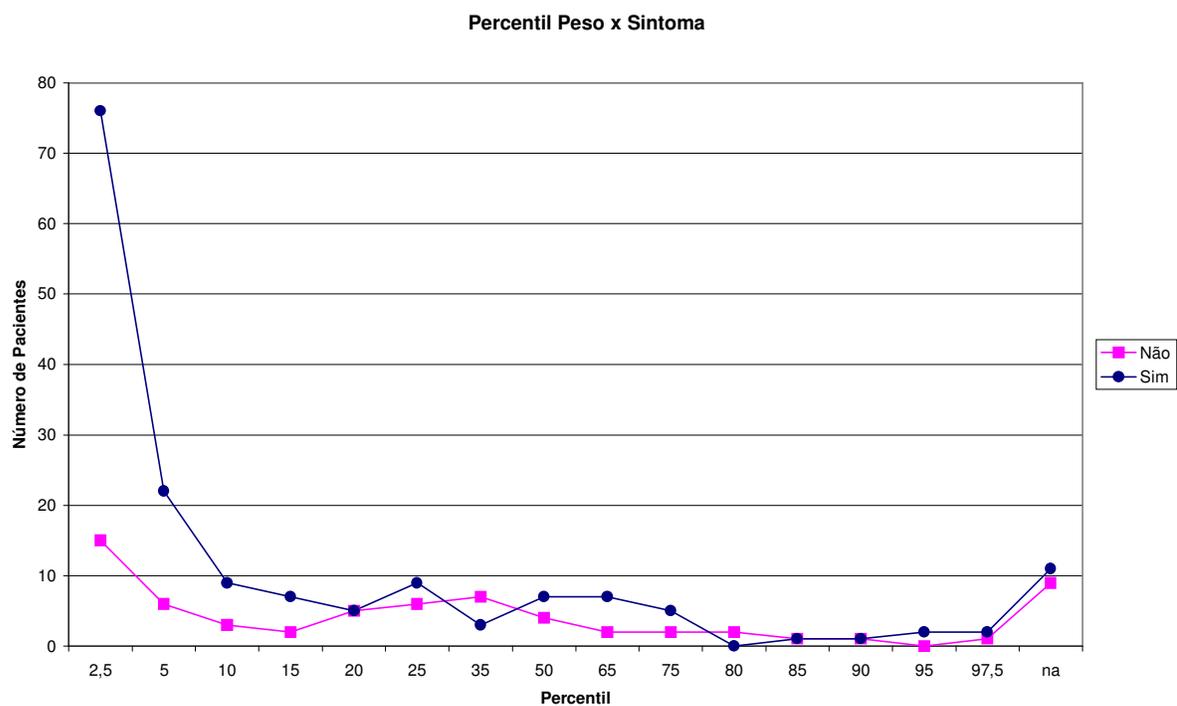
O acompanhamento do crescimento dos pacientes analisando-se o peso em cada visita demonstrou que virtualmente todas as crianças apresentavam percentil abaixo de 50 (MARCONDES, 1991) (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 4. DISTRIBUIÇÃO DOS PERCENTIS DE PESO PELA IDADE EM MESES.



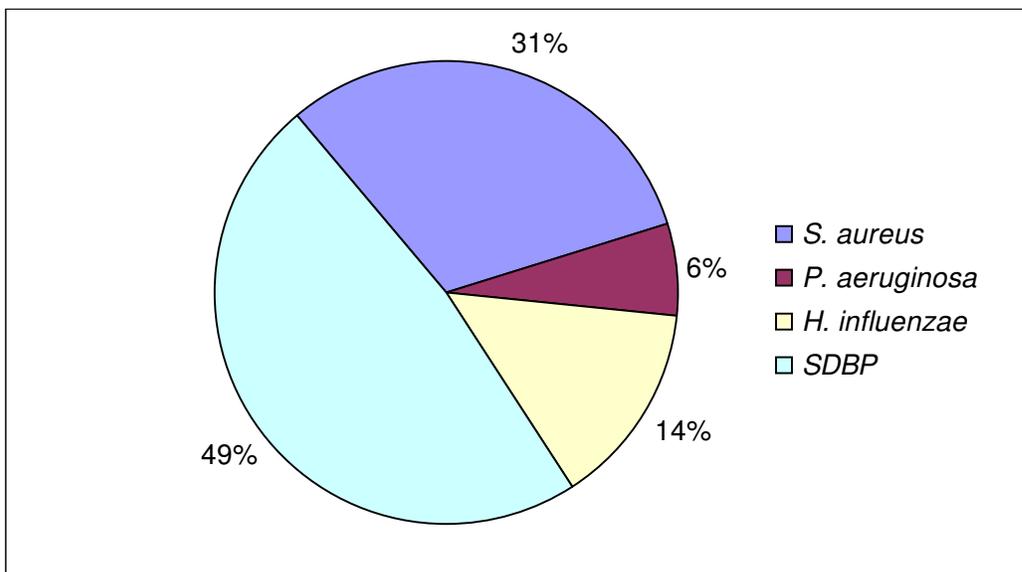
A variável peso apresentou associação com a presença de sintomas ( $p=0,01$ ): quanto maior o peso, menor a incidência de sintomas de exacerbação da infecção (GRÁFICO 6) . Não se pode demonstrar correlação entre as variáveis peso e tipo de bactéria ( $p=0,28$ ).

GRÁFICO 5. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS PESO E PRESENÇA DE SNTOMAS



As contagens de colônias variaram na ordem de 1 a 100 UFC, portanto não foram consideradas devido à pequena variação. As bactérias de interesse para a população estudada, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Burkholderia cepacia* foram isoladas em 100 amostras (42,7%), nas proporções apresentadas no GRÁFICO 7.

GRÁFICO 6. PROPORÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Haemophilus* spp NAS AMOSTRAS.



O primeiro patógeno a ser isolado nas culturas foi *Staphylococcus aureus* em 18 pacientes, e *Haemophilus influenzae* em 10 pacientes, sendo que em 4 deles estes dois patógenos foram isolados concomitantemente na primeira cultura positiva. *Pseudomonas aeruginosa* foi o primeiro patógeno a ser isolado em somente 2 pacientes, sendo que em um deles foi isolado concomitantemente *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*.

***Staphylococcus aureus*:** dos 19 pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidas 73 amostras bacterianas, sendo que, destas, 18 eram oxacilina-resistentes (24,6%). Do total de 19 pacientes, 3 apresentaram MRSA, sendo que 2 deles tiveram quase a totalidade das amostras com esta característica (13/14 e 4/6) e um outro paciente teve apenas uma amostra em um total de três. Os dois primeiros pacientes citados foram internados por várias vezes durante o estudo. Dos 19 pacientes, 6 estavam persistentemente colonizados (uma vez colonizado, todas as amostras consecutivas foram positivas para *Staphylococcus aureus*). A maior taxa de amostras positivas por paciente foi verificada com esta bactéria (39,67% com intervalo de confiança de 16,09 a 63,25%) (TABELA 1). O tempo médio decorrido até o primeiro isolamento foi de 214 dias, com um intervalo de confiança de 120 a 309 dias.

***Pseudomonas aeruginosa*:** dos 9 pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidas 15 amostras bacterianas, sendo que todas eram multi-sensíveis e não-mucóides. Do total de nove pacientes, seis foram anteriormente colonizados com *Staphylococcus aureus*, e um com com *Haemophilus influenzae*. Nenhum paciente foi colonizado persistentemente com *Pseudomonas aeruginosa*, e em nenhum deles *Pseudomonas aeruginosa* foi o primeiro patógeno a ser isolado. Das amostras positivas para *Pseudomonas aeruginosa*, em uma foi isolado concomitantemente

*Haemophilus* spp, em outra MRSA, em outra MSSA, em outras duas *Haemophilus* spp e MSSA, e em 8 amostras não foi isolado outro patógeno. A média de amostras positivas por paciente foi de 15,6% com um intervalo de confiança de 0 a 43,5% (TABELA 1), e o tempo médio decorrido até o primeiro isolamento foi de 358 dias, com um intervalo de confiança de 164 a 553 dias.

***Haemophilus* spp:** dos 19 pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidas 33 amostras bacterianas, sendo que 28 foram testadas para produção de beta-lactamase. Oito eram produtoras da enzima (28,6% das amostras testadas) e 20 não. Nenhum paciente foi colonizado persistentemente com *Haemophilus* spp. A média de amostras positivas por paciente foi de 18,7%, com um intervalo de confiança de 0 a 37,6%.

TABELA 1: RESULTADOS DO TESTE DE PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA AS BACTÉRIAS DE INTERESSE EM FC, POR PACIENTE.

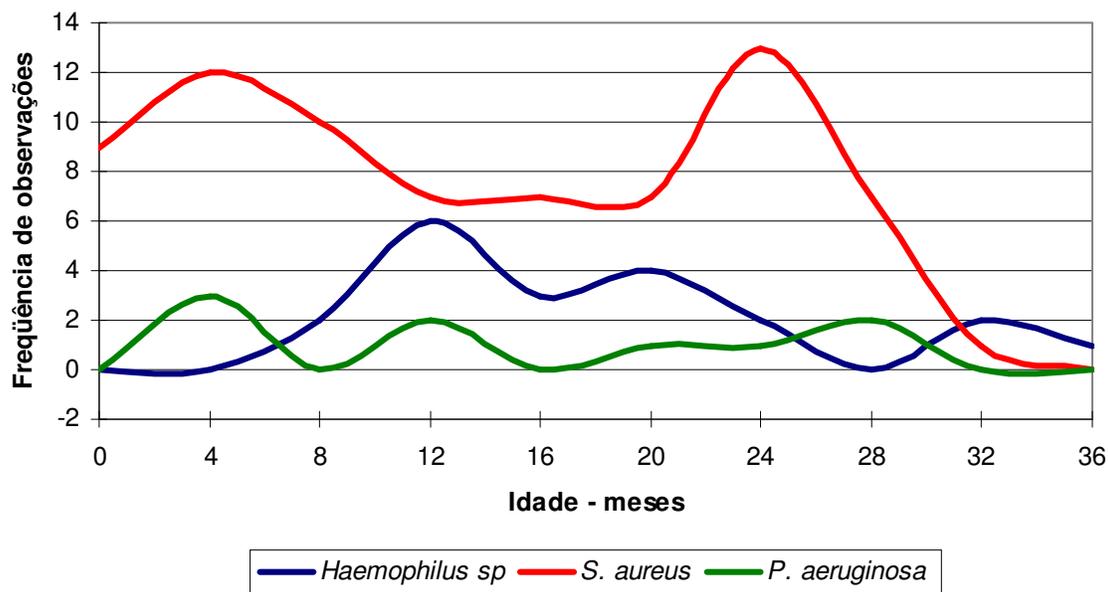
BACTÉRIA	AMOSTRAS POSITIVAS	PROPORÇÃO (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	73/234	39,67	16,1 - 63,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15/234	15,6	0 - 43,5
<i>Haemophilus influenzae</i>	33/234	18,7	0 - 37,6

***Burkholderia cepacia:*** foram obtidas duas amostras de um mesmo paciente, em coletas consecutivas, com contagens baixas (20 UFC nas 2 amostras) e as duas eram multi-sensíveis. O paciente era colonizado persistentemente com MRSA, e não apresentou *Burkholderia cepacia* nas culturas subseqüentes.

Não foram isolados *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* nas amostras estudadas.

A frequência das bactérias isoladas, analisando-se a idade dos pacientes no momento da coleta, demonstrou uma tendência de queda para *Staphylococcus aureus* e manutenção em níveis estáveis para *Haemophilus* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (GRÁFICO 7).

GRÁFICO 7. FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS POR IDADE.



Foram analisadas 69 amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus*, provenientes de 18 pacientes, quanto ao perfil bioquímico (biotipo) e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (antibiotipo). Dos 18 pacientes, 4 tinham apenas uma amostra bacteriana cada, e portanto não foram incluídos nesta análise preliminar. Dos demais, 10 apresentaram mais da metade das suas amostras bacterianas com biotipos e antibiogramas que sugeriam tratar-se do mesmo clone, e outros 4 tinham amostras com perfis diferentes, seja quanto ao biotipo ou ao antibiograma.

Sessenta e cinco amostras de *Staphylococcus aureus* foram encaminhadas ao LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina, em São Paulo, SP, para tipagem molecular através da análise dos fragmentos obtidos por restrição do DNA cromossômico por PFGE. As amostras de MRSA foram comparadas com o clone brasileiro de MRSA na mesma análise. Foram obtidos ao total 21 perfis eletroforéticos distintos.

Conforme pode ser observado na figura 2, segundo os critérios de interpretação de Tenover e colaboradores (TENOVER, 1995), as amostras 1, 2 e 3 são idênticas; as amostras 5 e 6 são idênticas e estreitamente relacionadas à amostra 4; as amostras 7 e 8 são idênticas e estreitamente relacionadas à amostra 9; as amostras 11 e 12 são idênticas e possivelmente relacionadas à amostra 10; as amostras 13 e 14 são idênticas; e as amostras 15 e 16 são idênticas (as amostras 13 a 16 foram isoladas do mesmo paciente, e constituem dois clones distintos).

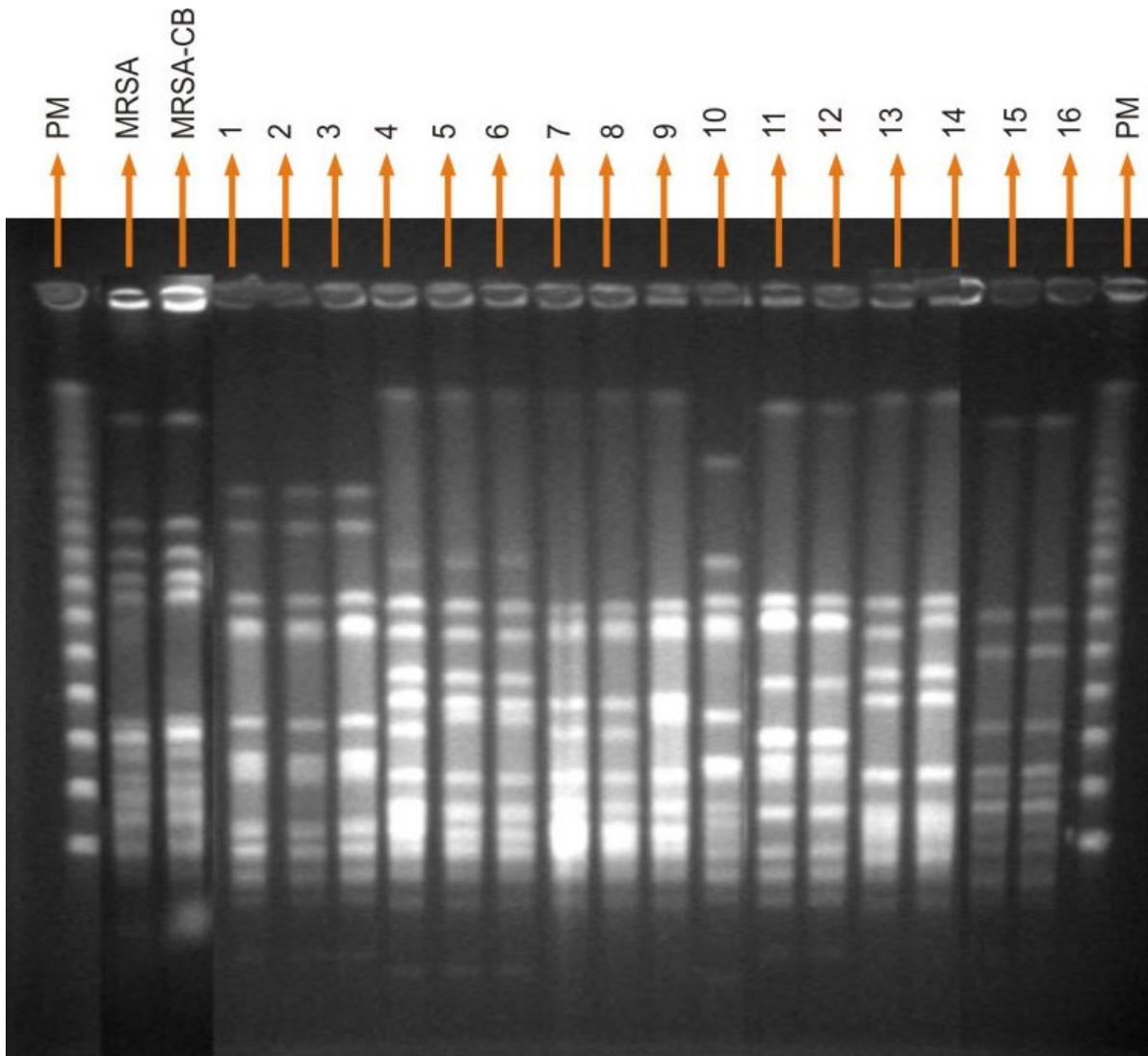
As amostras de MRSA obtidas de dois pacientes (10 de um paciente e 3 do outro) apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro (FIGURA 2). Uma outra amostra de MRSA pertencente a um paciente como amostra única (somente uma amostra em todo o estudo) demonstrou ser distinta do clone brasileiro. As demais amostras bacterianas, todas de MSSA, distribuíram-se entre 18 perfis eletroforéticos quando comparadas as amostras de um mesmo paciente (FIGURA 2).

A determinação das CIM dos antibióticos testados frente às amostras de *Staphylococcus aureus* demonstrou que todos apresentaram elevada potência, com CIM<sub>50</sub> abaixo dos pontos de corte para sensibilidade, sendo a vancomicina o mais ativo, com CIM<sub>90</sub> também abaixo deste valor, enquanto os outros antimicrobianos testados apresentaram valores acima do ponto de corte para resistência (TABELA 2). Analisando-se as sensibilidades, a vancomicina foi o antimicrobiano com maior número de cepas sensíveis (100%), com os outros agentes apresentando sensibilidades que variaram de 64,2 a 76,1%.

TABELA 2: SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E VALORES DE CIM<sub>50</sub> E CIM<sub>90</sub> DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS.

ANTIBIÓTICO	PONTOS DE CORTE	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	% SENSIBILIDADE
Ciprofloxacino	S≤1; R≥4	< 0,5	> 16	73,5
Eritromicina	S≤0,5; R≥8	< 0,25	> 32	68,6
Gentamicina	S≤4; R≥16	< 1,0	> 64	64,2
Oxacilina	S≤2; R≥4	< 0,5	> 16	75,0
Sulfametoxazol-trimetoprim	S≤2/38; R≥4/76	< 19/1,0	> 304/16	76,1
Vancomicina	S≤4; R≥32	< 0,5	< 0,5	100,0

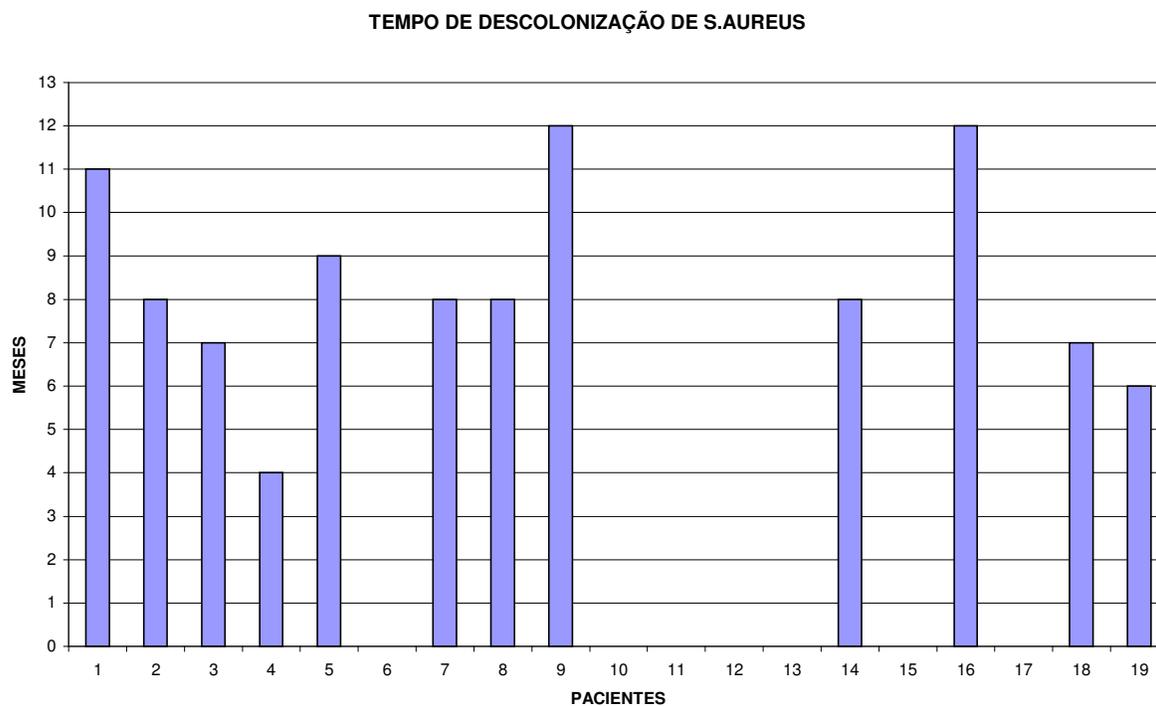
FIGURA 3: PERFIS DE PFGE DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*.



OBS.: PM = marcador de peso molecular; MRSA = padrão das amostras de MRSA isoladas; MRSA-CB = clone brasileiro de MRSA; 1 a 20 = perfis de amostras de MSSA isoladas.

Observando-se o tempo que cada paciente permaneceu descolonizado de *Staphylococcus aureus*, podemos afirmar que na maioria dos casos a terapêutica instituída quando do isolamento desta bactéria foi eficiente por tempos que variaram de 4 a 12 meses (GRÁFICO 9).

GRÁFICO 8 – INTERVALOS DE TEMPO EM QUE OS PACIENTES ESTIVERAM LIVRES DE *Staphylococcus aureus*.



Analisando a evolução da colonização por *Staphylococcus aureus* nos pacientes, pode-se observar que, dos 19 pacientes que apresentam esta bactéria nas suas culturas, sete o fizeram de maneira esporádica, três de maneira intermitente com a mesma linhagem e sete de modo persistente. Os demais pacientes tiveram históricos exclusivos, e todas as observações estão contidas no QUADRO 4.

QUADRO 4. EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Staphylococcus aureus*.

OBSERVAÇÃO	PACIENTES
Colonização esporádica.	1, 2, 4, 5, 9 e 16
Colonização intermitente com a mesma cepa.	3, 7 e 17
Colonização persistente.	6, 10, 11, 12, 13, 15 e 17
Colonização primária com MSSA, aquisição posterior de MRSA e manutenção até o final do estudo.	15
Colonização em três episódios consecutivos com a mesma cepa, descolonização e manutenção até o final do estudo.	8 e 18
Colonização primária por MSSA, aquisição posterior de MRSA distinto do clone brasileiro e distinto do MSSA anterior, em um episódio.	19
Colonização com dois clones diferentes de MSSA.	13 e 14

## 5. DISCUSSÃO

A FC é causada por mutações no gene *CFTR* que, por alterações na viscosidade das secreções exócrinas dos pacientes afetados, entre elas o muco das vias aéreas, induz à infecção endobrônquica crônica que será ao final responsável pela evolução fatal de praticamente todos os pacientes. Somente um número limitado de espécies bacterianas pode ser responsabilizado por estas infecções, entre elas *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* em crianças, e *Pseudomonas aeruginosa* em adolescentes e adultos (BURNS, 1998).

A população de pacientes observada no presente estudo compreende crianças na primeira infância, variando de um mês a 3 anos de idade. O esperado era, portanto, que a maioria dos colonizados o fosse por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, o que veio a se confirmar pelo isolamento de *Staphylococcus aureus* em 19 dos 25 pacientes (76% do total). *Haemophilus* spp foi também isolado na mesma proporção de indivíduos, embora em um número menor de amostras por paciente (18,7% das amostras dos pacientes com *Haemophilus* sp contra 39,67% das amostras dos pacientes com *Staphylococcus aureus*). *Burkholderia cepacia* foi encontrado em apenas duas amostras não consecutivas de um mesmo paciente, com fenótipo multissensível, o que caracteriza ser um achado esporádico.

Antes do advento da antibioticoterapia, *Staphylococcus aureus* era considerado o principal agente infeccioso dos pacientes com FC. O uso comum de terapia antiestafilocócica em muitas partes do mundo levantou dúvidas quanto ao aumento da susceptibilidade à infecção por outros agentes como *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*, com tal tratamento profilático, como sugerido na pesquisa clínica de Ratjen e colaboradores (2001). Um dado interessante é que a colonização crônica das vias aéreas na FC por *Pseudomonas aeruginosa* é reduzida em regiões onde a terapia antiestafilocócica é administrada estritamente com base na necessidade, ao invés de profilaticamente (GOVAN, 1987). Está claro, portanto, que até o momento as conclusões sobre o papel patogênico de *Staphylococcus aureus* na doença pulmonar da FC provêm de observações clínicas, principalmente da interpretação de culturas de orofaringe positivas para a bactéria como indicativas da sua presença no trato respiratório inferior. Faltam estudos definitivos demonstrando um possível efeito do tratamento contra *Staphylococcus aureus* quando isolado de culturas de orofaringe obtidas de amostras clínicas de pacientes com FC (LYCZAK, 2002).

Atualmente *Staphylococcus aureus* é menos comum na infecção pulmonar, talvez como resultado do desenvolvimento de antibióticos anti-estafilocócicos efetivos e do aumento da sobrevida dos pacientes com FC. Uma evidência disto é uma pesquisa em culturas *post mortem* entre 1939 e 1945, a qual mostrou que a bactéria foi isolada de 92% dos casos, em contraste com 22% no Centro Dinamarquês de FC em 1976, e 28% nos Estados Unidos em 1990 (FITZSIMMONS, 1993).

A persistência de *Staphylococcus aureus* há muito vem sendo relatada em infecções crônicas de pacientes jovens com FC. Hoiby, em 1982, relatou a incidência de *Staphylococcus aureus* em 20% de todas as exacerbações pulmonares de pacientes com FC. Estes pacientes são freqüentemente tratados com antimicrobianos profiláticos para prevenir complicações pulmonares associadas à infecção por *Staphylococcus aureus*, freqüentemente com SXT. Apesar da maioria das amostras ser sensível, diversos estudos relataram a emergência de cepas SXT-resistentes em pacientes com FC durante ou após a terapia com este agente. Meios contendo baixo teor de timidina não permitem o crescimento destas cepas, por isso as mesmas foram denominadas “timidina-dependentes” (GILLIGAN, 1987). Atualmente, a denominação mais utilizada, SCV (*small-colony variants*), refere-se ao fenótipo de colônias pequenas, não-pigmentadas e não-hemolíticas, que produzem quantidades muito reduzidas de  $\alpha$ -hemolisina, persistindo intracelularmente em sistemas *in vitro* (KAHL, 2003). A suscetibilidade diminuída das variantes SCV pode contribuir para o seu isolamento após terapia antibiótica prolongada devido à seleção que pode ocorrer nas vias aéreas do paciente. Estas cepas podem ser facilmente negligenciadas durante a análise microbiológica de secreções respiratórias de pacientes com FC, devido ao crescimento fastidioso e à presença freqüente de supercrescimento de outras espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente nos pacientes mais velhos (KAHL, 1998). No presente estudo, embora a colonização com *Staphylococcus aureus* tenha sido relatada com expressiva freqüência e persistência, não foram isoladas SCV, como de fato era de se esperar, tendo em vista que nenhum dos pacientes estava recebendo terapia com SXT.

A causa da presença precoce e persistente de *Staphylococcus aureus* é desconhecida, mas sabe-se que este microrganismo é freqüentemente encontrado em culturas de orofaringe de crianças normais após doença viral aguda e terapia antibiótica. Em crianças com FC, *Staphylococcus aureus* contribui possivelmente para endobronquite precoce, predispondo à colonização subsequente por *Pseudomonas aeruginosa*. A relação entre as duas bactérias não é conhecida completamente, mas sabe-se que infecção prévia por *Staphylococcus aureus* pode contribuir para a inflamação das vias aéreas, produção alterada de muco ou dano epitelial, facilitando assim a aderência de *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus aureus* pode lesar a via aérea por liberação de toxinas extracelulares ou estimulação da resposta inflamatória. *Pseudomonas aeruginosa* não adere ao epitélio respiratório na ausência de lesão, desnutrição, infecção prévia, co-infecção viral ou por outras bactérias (BARTH E PITT, 1998).

Um estudo recente determinou a duração e a dinâmica da persistência de *Staphylococcus aureus* nas vias aéreas de pacientes com FC em um período de 6 anos. A média de idade dos pacientes foi de 9,5 anos no início do estudo (variando de 1 a 33) e 14,5 anos no final. Foram analisadas amostras de escarro e orofaringe, e foi considerada infecção persistente por *Staphylococcus aureus* quando isolado por mais de 6 meses (KAHL, 2003). O tempo médio de

persistência foi de 37 meses, variando de 6 a 70 meses, com os isolados SCV persistindo por mais tempo que os de *Staphylococcus aureus* “padrão”, embora sem diferença estatisticamente significativa. O perfil eletroforético por PFGE identificou 6 clones prevalentes, isolados de mais de um paciente, e 39 clones individuais, isolados de pacientes diferentes. A maioria dos pacientes apresentava clones únicos.

Embora tendo estudado uma população diferente quanto à idade e ao tipo de amostras coletadas, o presente estudo pode ser comparado ao acima citado, tendo em vista os objetivos a que se propôs e a metodologia utilizada. As amostras de MSSA analisadas molecularmente, pelo mesmo método utilizado no estudo de Kahl e colaboradores, indicaram que, comparando-se as amostras bacterianas de todos os pacientes, diferentes clones estavam presentes. As amostras bacterianas distribuíram-se entre 18 perfis eletroforéticos; considerando-se a identidade ou similaridade quando comparadas as amostras entre si para um mesmo indivíduo, verificou-se que a mesma linhagem persistiu colonizando o paciente durante o período do estudo.

O isolamento de MRSA vem aumentando em frequência, e isto tem levado a pensar que estas cepas podem se tornar um problema clínico maior que MSSA, ou, por outro lado, podem ser uma fonte de disseminação de MRSA no hospital e na comunidade.

O significado clínico da infecção por MRSA na FC ainda não foi estabelecido. Um estudo recente analisou crianças com FC durante um período de sete anos cujas culturas de secreções respiratórias revelaram a presença de MRSA. Foram selecionados controles quanto à idade, sexo e função respiratória, para comparar testes de função respiratória, dados antropométricos, achados radiológicos, e uso de terapia antimicrobiana e esteróides um ano antes e um ano depois da infecção por MRSA. As crianças com MRSA apresentaram ganho de estatura significativamente menor e precisaram de duas vezes mais antibióticos intravenosos que os controles após um ano. Tiveram também achados radiológicos significativamente piores ao tempo do primeiro isolamento de MRSA e um ano depois, mas não mostraram aumento do declínio do quadro radiológico pulmonar. Não houveram diferenças significativas entre os dois grupos com respeito a peso, índice de massa corporal e escore Shwachman. Também não houve diferença significativa no uso anterior de esteróides ou antibióticos inalatórios. Desta forma, os autores concluíram que a infecção por MRSA em crianças com FC não afeta significativamente a função respiratória, mas tem um efeito adverso no crescimento. Estas crianças requerem antibióticos intravenosos em quantidade significativamente maior e têm uma imagem radiográfica de tórax pior que os controles (MIALL, 2001).

No presente estudo apenas dois pacientes apresentaram infecção persistente por MRSA, com a quase totalidade das amostras bacterianas com este fenótipo. As amostras obtidas (10 de um paciente e 3 do outro) apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro. Os dois pacientes provavelmente adquiriram a bactéria nas internações a que foram submetidos por várias

vezes. Estes pacientes apresentaram curvas de ganho de peso constantemente abaixo do percentil 2,5, o que pode ser comparado aos dados de Miall e colaboradores, embora nossa amostragem tenha sido bem menor (2 pacientes *versus* 14 pacientes no estudo citado). O paciente que apresentou MRSA por mais tempo tinha uma função pulmonar persistentemente ruim durante todo o período do estudo, enquanto o outro teve um quadro de íleo meconial, necessitando de cirurgia logo nos primeiros meses de vida. Uma outra amostra de MRSA pertencente a um paciente como isolado único (somente uma amostra em todo o estudo), demonstrou pertencer a um clone distinto do clone brasileiro. Este paciente nunca foi internado. Os dados analisados permitiram sugerir que a colonização por MRSA tende a ser persistente e de erradicação mais difícil do que a colonização por MSSA.

*Pseudomonas aeruginosa* tem sido, nas duas últimas décadas, o patógeno mais importante do trato respiratório na FC, com taxas de colonização que variam de 50 a 70%, em diferentes centros de tratamento. Embora os pacientes possam ser colonizados pela bactéria já nos primeiros anos de vida, ela não é comumente isolada do trato respiratório até a infância tardia e adolescência, seguindo a colonização por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. O papel dessas bactérias na patogenia da doença pulmonar permanece controverso, já que *Pseudomonas aeruginosa* quando coloniza pacientes com FC é raramente erradicada (REIS, 1998).

As cepas iniciais de *Pseudomonas aeruginosa* que infectam pacientes com FC são descritas como “planctônicas”. Estas cepas tendem a ser sensíveis a uma variedade de antimicrobianos, são móveis e prototróficas, e têm lipopolissacáride liso. É neste estágio que alguns investigadores acreditam que a terapia antimicrobiana agressiva possa erradicar esta bactéria; no entanto, muitos pacientes desenvolvem infecção crônica com o fenótipo “mucóide”. As amostras mucóides são imóveis, freqüentemente auxotróficas, têm lipopolissacáride rugoso, e são freqüentemente resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos. Estes isolados crescem como biofilmes nas vias aéreas dos pacientes com FC. O exame do escarro de pacientes cronicamente infectados com amostras mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* revela bacilos gram-negativos em pequenos grupos circulados por material amorfo que se cora gram-negativo. Este material é o polímero polissacarídico denominado alginato, que forma a matriz do biofilme e torna os organismos nele mergulhados refratários ao clearance pelo sistema imune (MILLER e GILLIGAN, 2003).

A produção do lipopolissacáride rugoso se dá geralmente por cepas de muito baixa toxigenicidade, o que talvez explique porque atingem uma densidade tão alta na árvore traqueobrônquica da FC, sem invadir ou causar toxemia no paciente infectado. As cepas mucóides predominam em pacientes com FC, em contraste às isoladas em pacientes com outras doenças, e se porventura cepas mucóides são isoladas de pacientes não-FC, elas estão geralmente

associadas a infecções crônicas. As amostras não-mucóides são freqüentemente encontradas no início da colonização, ou quando a infecção é ainda intermitente (REIS, 1998). Ao tornar-se crônica, as amostras mucóides as substituem, como foi comprovado em estudos *in vitro*, que demonstraram que isolados não-mucóides aderem em maior número às células epiteliais bucais do que os mucóides. As amostras mucóides estão associadas, além disso, com resposta pronunciada de anticorpos, diferentemente do que se dá com as cepas não-mucóides (HOIBY, 1982). A pequena minoria de pacientes que não adquirem *Pseudomonas aeruginosa* mucóide, inclusive aqueles somente portadores de cepas não-mucóides da bactéria, apresentam função pulmonar significativamente melhor ao longo do tempo comparando-se com pacientes de FC infectados com cepas mucóides. Conforme a função pulmonar piora, o isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* não tipável também diminui, indicando que estas bactérias provavelmente não têm um papel importante neste estágio da patogênese da doença pulmonar da FC (LYCZAK, 2002).

O grupo de Ramsey publicou recentemente um estudo longitudinal abordando as alterações fenotípicas e genotípicas em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de orofaringe e lavado broncoalveolar de crianças pequenas com FC, em um coorte de 40 pacientes durante os três primeiros anos de vida. Foi verificada uma grande variabilidade genotípica, cada paciente apresentando genótipos exclusivos. Cepas isoladas precocemente apresentavam um fenótipo distinto das cepas comuns de FC: geralmente não-mucóides e sensíveis a antimicrobianos. Os resultados das culturas demonstraram que 72,5% dos pacientes albergavam *Pseudomonas aeruginosa* em seus três primeiros anos de vida. Combinando os resultados de cultura com testes sorológicos, 97,5% dos pacientes tinham evidências de infecção até esta idade, o que sugeriu que a infecção por esta bactéria ocorre precocemente na FC e pode ser intermitente ou não detectável por cultura (BURNS, 2001).

Os resultados do presente estudo foram semelhantes, embora com uma incidência bem menor de *Pseudomonas aeruginosa*, apesar da metodologia laboratorial utilizada ser essencialmente a mesma. Apenas 36% dos pacientes apresentaram este patógeno nas culturas, com nenhum dos pacientes sendo colonizado persistentemente. As amostras foram todas multissensíveis e não-mucóides. Os resultados de Ramsey alertam para a necessidade do uso de recursos laboratoriais sensíveis para isolamento do patógeno e pesquisa de anticorpos específicos no sentido de detectar precocemente a infecção e a inflamação típicas da doença.

*Haemophilus influenzae* é a terceira bactéria mais comum isolada do trato respiratório de pacientes com FC (aproximadamente 15% dos pacientes). O microrganismo pode ser tipicamente isolado de amostras de crianças com FC obtidas por broncoscopia e cultivadas quantitativamente, mas é raramente isolado de adultos com FC. A incapacidade de detectar *Haemophilus influenzae*

em adultos com FC pode ser explicada por provável sobreposição do seu crescimento por colônias de *Pseudomonas aeruginosa* mucóide (MILLER e GILLIGAN, 2003).

*Haemophilus influenzae* está frequentemente envolvido em infecções pulmonares crônicas e exacerbações agudas de pacientes com FC, principalmente crianças na primeira infância. A bactéria é geralmente não-tipável, o que é característica das cepas isoladas de pacientes com outras doenças respiratórias crônicas. A produção de  $\beta$ -lactamase tem sido observada em até 20% dos pacientes com FC, com variações de um centro para o outro (GILLIGAN, 1991). Em um estudo recente realizado na Espanha, foram estudadas 188 amostras de *Haemophilus influenzae* isoladas de 30 pacientes com FC durante um período que variou de um a sete anos. Foram caracterizados 115 genótipos por tipagem eletroforética por PFGE, e na maioria dos pacientes foi observada colonização crônica com múltiplos clones da bactéria. A resistência a antimicrobianos estava associada com persistência por extensos períodos de tempo. Os autores concluíram que as amostras de *Haemophilus influenzae* isoladas de pacientes com FC apresentam uma prevalência acentuada de cepas hipermutáveis (ROMAN, 2004).

O presente estudo não detectou persistência de colonização por *Haemophilus* spp, embora, como Barth e Pitt já alertaram em uma revisão de 1998, a discrepância na frequência desta bactéria pode ser devida ao método usado para o seu isolamento de amostras respiratórias. O supercrescimento de bactérias da microbiota da orofaringe, especialmente estreptococos do grupo “viridans”, pode dificultar a visualização das colônias transparentes e pequenas de hemófilos, especialmente se não for utilizado um meio com enriquecimento específico para o seu crescimento, como o suplemento VX. Das 28 amostras testadas para produção de  $\beta$ -lactamase, oito apresentaram-se produtoras da enzima, ou seja 28%, algo superior ao observado no estudo espanhol.

Poucos trabalhos citam o isolamento de *Streptococcus pneumoniae* em secreções respiratórias de pacientes com FC. Gilligan, em uma extensa revisão publicada em 1991, considerou que esta bactéria poderia ser isolada ocasionalmente de amostras respiratórias de pacientes com FC, embora qualquer papel que pudesse ter na doença pulmonar destes pacientes provavelmente seria secundário (GILLIGAN, 1991). Nas culturas dos pacientes envolvidos em nosso estudo foram obtidas 20 amostras de *Streptococcus pneumoniae* de 16 pacientes, mas não foi atribuída significância a estes achados. Bacilos gram-negativos outros que não *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* não foram considerados relevantes e foram ignorados.

A vigilância do aparecimento de amostras de *Burkholderia cepacia* é uma preocupação constante para as pessoas envolvidas no cuidado de pacientes com FC. O prognóstico assustador que envolve o surgimento desta bactéria justifica todos os esforços empreendidos no isolamento quase sempre difícil deste patógeno. Embora a população envolvida em nosso estudo compreendesse crianças em sua maioria ainda não infectadas cronicamente, em uma delas foi

isolada *Burkholderia cepacia* em duas amostras consecutivas, mas a bactéria não persistiu por mais tempo. O fenótipo multissensível levou-nos a crer se tratar de um achado irrelevante, num paciente cronicamente infectado com MRSA e tratado prolongadamente com diversos antibióticos.

## 6. CONCLUSÕES

1. *Staphylococcus aureus* foi o primeiro patógeno isolado e a bactéria que apresentou maior ocorrência por paciente e no total da população estudada.
2. A colonização por *Haemophilus* spp foi transitória, com baixo número de isolamentos por paciente. A incidência de amostras produtoras de  $\beta$ -lactamase na população estudada foi alta.
3. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou-se não-persistente e com fenótipos não-mucóides e multissensíveis, sugerindo que a infecção foi intermitente e não crônica.
4. As linhagens de *Staphylococcus aureus* sensíveis apresentaram-se como policlonais e exclusivas de cada paciente, indicando que provavelmente foram adquiridas dentro do círculo social próprio. As linhagens de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) sugerem origem hospitalar, visto apresentarem perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro descrito por Sader, em 1994. A frequência de MRSA na população estudada é preocupante devido à possibilidade de disseminação a outros pacientes com FC.
5. Bactérias emergentes como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* não são frequentes nesta população.
6. A metodologia utilizada para o processamento das amostras pode ser recomendada para uso rotineiro nos laboratórios de microbiologia clínica. Para amostras de pacientes que fizeram ou fazem uso de SXT é necessário acrescentar uma placa de ágar manitol-salgado para inoculação inicial, com a finalidade de favorecer o isolamento de amostras SCV. Nas crianças colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa* é recomendável a pesquisa de *Burkholderia cepacia* através do uso de meio seletivo apropriado.
7. O tratamento utilizado permitiu que a maioria dos pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* fosse descolonizada e assim permanecesse por períodos de 4 a 12 meses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARON, S. D. *et al.* Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.40, n.11, p.4172-9, 2002.
- ABMAN, S. H. *et al.* Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. **J Pediatr**, v.119, n.2, p.211-7, 1991.
- ALTON, E.W.F.W. *et al.* Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. **Eur Respir J**, v.3, p.922-926, 1990.
- ANDERSEN, D. H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child**, v.56, p.344-399, 1938.
- ARMSTRONG, D. S. *et al.* Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.21, n.5, p.267-75, 1996.
- BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.384-404.
- BARTH, A. L.; PITT, T.L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Dis**, v.2, n.2, p.43-61, 1998.
- BETHEL, C. D.; BOONLAYANGOOR, S. Beta-lactamase tests. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.2, 2004a., p.5.3.1-5.3.6.
- \_\_\_\_\_. Oxacillin salt-agar screen test to detect oxacillin (methicillin)-resistant *Staphylococcus aureus*. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.2, 2004b., p.5.4.1-5.4.4.
- BURNS, J. L. *et al.* Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. **Clin Infect Dis**, v.27, n.1, p.158-63, 1998.
- BURNS, J. L. *et al.* Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v.183, n.3, p.444-52, 2001.
- BURNS, J. L. *et al.* Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v.38, n.5, p.1818-22, 2000.
- CAMARGOS, P. A., M. *et al.* Prognostic aspects of cystic fibrosis in Brazil. **Ann Trop Paediatr**, v.20, n.4, p.287-91, 2000.
- COHEN, M. L. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J Pediatr**, v.108, n.5 Pt 2, p.796-9, 1986.
- CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução 196/96**. Resolução sobre pesquisas envolvendo seres humanos, 1996.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2003 Annual Data Report**, Bethesda, Maryland, USA.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **Antibiotic Treatment for Cystic Fibrosis**. Kent, UK, 2002.

FITZSIMMONS, S. C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **J Pediatr**, v.122, n.1, p.1-9, 1993.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics**, v.23, n.3, p.545-9, 1959.

GILLIGAN, P. H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.4, n.1, p.35-51, 1991.

\_\_\_\_\_. Respiratory cultures from cystic fibrosis patients. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2004, p.3.11.3.1- 3.11.3.9.

GILLIGAN, P. H. *et al.* Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.25, n.7, p.1258-61, 1987.

GIOLO, S. R. **Análise de Dados Discretos**. S/ ed. Curitiba: UFPR – Departamento de Estatística (Notas de Aula).

GLASS, S.; HAYWARD, C.; GOVAN, J.R.W. Serum C-reactive protein in assessment of pulmonary exacerbations and antimicrobial therapy in cystic fibrosis. **J Pediatr**, v.113, n.1 Pt 1, p.76-9, 1988.

GOVAN, J. R. W.; DOHERTY, C.; GLASS, S. Rational parameters for antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. **Infection**, v.15, n.4, p.300-7, 1987.

GOVAN, J. R. W.; NELSON, J.W. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. **Br Med Bull**, v.48, n.4, p.912-30, 1992.

HEARST, J. E.; ELLIOTT, K. E. Identifying the killer in cystic fibrosis. **Nat Med**, v.1, n.7, p.626-7, 1995.

HOIBY, N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. **Acta Paediatrica Scand Suppl**, v.301, p.33-54, 1982.

HUDSON, V. L.; GUILL, M. F. New developments in cystic fibrosis. **Pediatr Ann**, v.27, n.8, p.515-20, 1998.

HUDSON, V. L., WIELINSKI, C. L.; REGELMANN, W.E. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. **J Pediatr**, v.122, n.6, p.854-60, 1993.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.1108-1127.

KAHL, B. *et al.* Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v.177, n.4, p.1023-9, 1998.

KAHL, B. C. *et al.* Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. **J Clin Microbiol**, v.41, n.1, p.410-3, 2003.

KAHL, B. C. *et al.* Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. **J Clin Microbiol**, v.41, n.9, p.4424-7, 2003.

KILIAN, M. *Haemophilus*. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.623-635.

KISKA, D. L.; GILLIGAN, P.H. *Pseudomonas*. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.719-728.

KONEMAN, E. W. A. *et al.* Técnicas para o cultivo de amostras. In: (Ed.). **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido - Quinta Edição**. Rio de Janeiro, RJ: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2001, p.97-99. (Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology - Fifth Edition).

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.2, .p.194-222, 2002.

MARCONDES, E. *et al.* Crescimento e desenvolvimento. In: E. Marcondes (Ed.) **Pediatria Básica**. São Paulo, SP: Sarvier, 1991, p. 53-58.

MAIZ, L. *et al.* Aerosolized vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.26, n.4, p.287-9, 1998.

MCCAFFERY, K. *et al.* Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. **Thorax**, v.54, n.5, .p.380-3, 1999.

MIALL, L. S. *et al.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v.84, n.2, p.160-2, 2001.

MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.9, p.4009-15, 2003.

MRSA IN CYSTIC FIBROSIS. London, 16 June 1997. **J Hosp Infect**, v.40, n.3, p.179-91, 1998.

MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Nebulised antipseudomonal antibiotic therapy in cystic fibrosis: a meta-analysis of benefits and risks. **Thorax**, v.51, n.4, .p.364-8, 1996.

MUNRO, S. Disk diffusion test. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2004. p.5.1.1- 5.1.15.

MURRAY, P. R. **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1. 2003. 2.322 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) **M100-S14**. MIC interpretive standars for *Staphylococcus* spp. 2004.

OLIVEIRA, M. C. L. A. *et al.* Prognostic factors in cystic fibrosis in a single center in Brazil: A survival analysis. **Pediatr Pulmonol**, v.34, n.1, p.3-10, 2002.

RAMSEY, B. W. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med**, v.335, n.3, p.179-88, 1996.

RAMSEY, B. W. *et al.* Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. **N Engl J Med**, v.340, n.1, p.23-30, 1999.

RAMSEY, B. W. *et al.* Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. **Am Rev Respir Dis**, v.144, n.2, p.331-7, 1991.

RASKIN, S. *et al.* DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am J Med Genet**, v.46, n.6, p.665-9, 1993.

RATJEN, F. *et al.* Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.31, n.1, p.13-6, 2001.

RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **Lancet**, v.361, n.9358, p.681-9, 2003.

REIMER, L. G.; CARROL, K.C. Procedures for the storage of microorganisms. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003. p.67-73.

REIS, F. J. C.; DAMACENO, N. Fibrose cística. **J Pediatr**, v.74, n.suplemento 1, p.S76-S94, 1998.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M.A.G.O.; RIBEIRO, A.F. Controvérsias na fibrose cística - do pediatra ao especialista. **J Pediatr**, v.78, supl. 2, p.S171-S186, 2002.

ROMAN, F. *et al.* Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. **J Clin Microbiol**, v.42, n.4, p.1450-9, 2004.

ROSENFELD, M. *et al.* Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.28, n.5, p.321-8, 1999.

ROSENFELD, M.; RAMSEY, B. Evolution of airway microbiology in the infant with cystic fibrosis: role of nonpseudomonal and pseudomonal pathogens. **Semin Respir Infect**, v.7, n.3, p.158-67, 1992.

ROSENSTEIN, B. J. What is a cystic fibrosis diagnosis? **Clin Chest Med**, v.19, n.3, p.423-41, 1998.

ROSENSTEIN, B. J.; CUTTING, G. R.. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. **J Pediatr**, v.132, n.4, p.589-95, 1998.

SADER, H. S.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M.A. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin Lab Med**, v.15, n.2, p.407-31, 1995.

SADER, H. S. *et al.* Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.15, n.5, p.320-323, 1994.

SAIMAN, L. *et al.* Evaluation of MicroScan Autoscan for identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v.41, n.1, p.492-4, 2003.

SANTOS, G. P. C. *et al.* Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J. Pediatr.** v.81, n.3, p.240-4, 2005.

SCHLICHTING, C. *et al.* Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. **J Clin Microbiol**, v.31, n.2, p.227-32, 1993.

SCHOFIELD, D. E.; COTRAN, R.S. Doenças da lactância e segunda infância. In: R. S. K. Cotran, V.; Collins, T. (Ed.). **Robbins Patologia Estrutural e Funcional - Sexta Edição**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000, p.412-440.

SCHRECKENBERGER, P. C. **Practical approach to the identification of glucose-nonfermenting gram-negative bacilli: a guide to identification**. Chicago, IL: University of Illinois College of Medicine at Chicago. 2000.

SCHWAB, U. E. *et al.* Increased adherence of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis lungs to airway epithelial cells. **Am Rev Respir Dis**, v.148, n.2, p.365-9, 1993.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, n.1, p.67-75, 1984.

SHREVE, M. R. *et al.* Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.37, n.3, p.753-7, 1999.

SHWACHMAN, H. ; KULCZYCKI, L.L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. **Am J Dis Child**, v.96, n.7, 1958, p.6-15.

SILBERT, S. **Pulsed-field gel electrophoresis**. São Paulo: Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, 2000.

SOARES, J. F.; COLOSIMO, E. A. **Métodos Estatísticos na Pesquisa Clínica**. S/ ed. Ribeirão Preto, SP: RBRAS-USP-UNESP, 1995, (40ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria e 6º Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agrônômica).

STERN, R. C. The diagnosis of cystic fibrosis. **N Engl J Med**, v.336, n.7, p.487-91, 1997.

STUTMAN, H. R. *et al.* Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. **J Pediatr**, v.140, n.3, p.299-305. 2002.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular Typing Methods. In: D. H. Persing, *et al.* (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Washington, DC: ASM Press, 1993, p.26-50.

SWENSON, J. M. *et al.* Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v.39, n.10, p.3781-4, 2001.

SWENSON, J. M. *et al.* Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.1181-1183.

SZAFF, M.; N. HOIBY. Antibiotic treatment of *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. **Acta Paediatr Scand**, v.71, n.5, p.821-6, 1982.

TENOVER, F. C. *et al.* How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.18, n.6, p.426-39, 1997.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233-9, 1995.

THE R DEVELOPMENT CORE TEAM. **Software R**. - Version 1.6.2 Patched (2003-10-01) 2003. <http://www.r-project.org/>.

THOMASSEN, M. J. *et al.* Multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v.140, n.6, p.873-80, 1979.

THOMASSEN, M. J. *et al.* Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. **J Pediatr**, v.104, n.3, p.352-6, 1984.

ULRICH, M. *et al.* Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.19, n.1, p.83-91, 1998.

WEAVER, L. T. *et al.* Prognosis in cystic fibrosis treated with continuous flucloxacillin from the neonatal period. **Arch Dis Child**, v.70, n.2, p.84-9, 1994.

WESTBROOK, G.; HOLMES, H. Epidemiologic Strain Typing. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2004, p.13.5.1-13.5.5.

WILCKEN, B.; WILEY, V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. **Paediatr Respir Rev**, v.4, n.4, p.272-7, 2003.

WILMOTT, R. W. Making the diagnosis of cystic fibrosis. **J Pediatr**, v.132, n.4, p.563-5, 1998.

WONG, K. *et al.* Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. **J Med Microbiol**, v.17, n.2, p.113-9, 1984.

WORLITZSCH, D. *et al.* Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. **J Clin Invest**, v.109, n.3, p.317-25, 2002.

YORK, M. K. Aerobic Bacteriology. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Ed.** Washington, DC: ASM Press, v.1, 2004. p.3.1.1. - 3.18.2.1.

ANEXO 1

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Seu filho(a) tem a doença denominada fibrose cística e está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado " **Estudo da evolução da colonização bacteriana na fibrose cística** ". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na Medicina, e a participação de seu filho(a) é de fundamental importância.

O objetivo desta pesquisa é acompanhar a infecção bacteriana do pulmão de crianças com fibrose cística que foram diagnosticadas pelo teste do pezinho, a fim de se tratar estas infecções e melhorar a condição de vida destes pacientes.

Caso seu filho(a) participe da pesquisa, será necessário fazer coleta de material da garganta (através de esfregaço da garganta com um palito comprido com algodão na ponta), em todas as consultas médicas de rotina, previamente agendadas. Para tanto seu filho(a) deverá comparecer ao Hospital de Clínicas para consultas médicas de acompanhamento e exames de laboratório, uma vez por mês por aproximadamente 1 ano.

Não há nenhum tipo de risco para seu filho(a) ao participar da pesquisa, e os benefícios esperados são: aumento da qualidade de vida dos pacientes, com a diminuição das infecções .

Os médicos responsáveis pelo atendimento de seu filho(a), **Dr. Nelson Augusto Rosário Filho** e **Dr. Carlos Antonio Riedi**, poderão ser contatados no Hospital de Clínicas, de segunda a sexta-feira, das 8 às 12 horas, no 14º andar, telefone: 360-1800 ramal 6216.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar que seu filho(a) participe do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do atendimento do seu filho(a), que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma de código, pois esses dados são confidenciais.

Pela participação no estudo, os pais ou responsáveis pelo paciente não receberão qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio Hospital de Clínicas.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de seu filho(a), e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual meu filho(a) foi convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação de meu filho(a) no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete seu tratamento com o médico dele(a). Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente com que meu filho(a) \_\_\_\_\_ participe deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal pelo paciente

Curitiba, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ANEXO 2

FICHA CLÍNICA



HOSPITAL DE CLÍNICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Serviço de Análises Clínicas  
Seção de Bacteriologia

**PROJETO DE TESE DE MESTRADO EM MICROBIOLOGIA  
DRA. HELENA HOMEM DE MELLO DE SOUZA**

**TÍTULO:** Estudo da evolução da colonização bacteriana na fibrose cística.

**QUESTIONÁRIO A SER APLICADO AOS PACIENTES:**

<b>NOME:</b> .....	<b>RG:</b> .....
<b>DATA NASCIMENTO:</b> ...../...../.....	<b>PROCEDÊNCIA:</b> .....
<b>VISITA DE ROTINA?</b> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>	<b>DATA ÚLTIMA VISITA:</b> ...../...../.....
<b>EXACERBAÇÃO DE SINTOMAS?</b>	SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>
<b>SINTOMAS RESPIRATÓRIOS:</b> TOSSE <input type="checkbox"/> CANSAÇO <input type="checkbox"/>	<b>OUTROS</b> <input type="checkbox"/> .....
<b>USO DE ANTIBIÓTICOS NOS ÚLTIMOS 15 DIAS?</b> <b>QUAIS?</b> .....	SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>
<b>PESO (PERCENTIL):</b> .....	<b>ESCORE Z:</b> .....
<b>PRESCRIÇÃO ANTIBIÓTICOS:</b> <b>QUAIS?</b> .....	SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>
<b>PREENCHIDO POR:</b> .....	<b>DATA:</b> ...../...../.....

<b>COLETA DE OROFARINGE</b>	
<b>COLETADO POR:</b> .....	<b>DATA:</b> ...../...../.....
<b>SECREÇÃO?</b>	SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>

### ANEXO 3

#### PROCESSAMENTO E INTERPRETAÇÃO DE CULTURAS DE OROFARINGE



**HOSPITAL DE CLÍNICAS**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**Serviço de Análises Clínicas**  
**Seção de Bacteriologia**

Projeto: Estudo da Evolução da Colonização Bacteriana na Fibrose Cística.

**PROCESSAMENTO E INTERPRETAÇÃO DE CULTURAS DE OROFARINGE**

1. Coleta de material de orofaringe (pilares tonsilares e faringe posterior) dos pacientes atendidos no Ambulatório 438 - Fibrose Cística RN (SAM-7), com swab estéril com haste de madeira e espátula de plástico (um único swab).
2. Após a coleta colocar o swab em tubo com 1ml de tampão PBSG (PBS com 0,1% de gelatina).
3. Ao chegar na Seção, registrar a entrada do exame no SIH e anexar o formulário de cultura de orofaringe.
4. Agitar em vortex por 30 segundos, aguardar alguns segundos, abrir o tubo e desprezar o swab.
5. Semear com alça calibrada 1:100 por esgotamento (como urina) em:
  - ágar-sangue
  - ágar-chocolate suplementado
  - ágar MacConkey
6. Incubar em estufa a 35-37°C as placas de ágar-sangue e ágar-chocolate por até 48 horas em jarra com tensão de CO<sub>2</sub> separada das outras culturas da rotina.
7. Incubar em estufa a 35-37°C as placas de ágar MacConkey por até 72 horas em atmosfera normal, em bandeja separada das outras culturas da rotina.
8. Anotar os tipos de colônias com as contagens correspondentes no formulário próprio (considerar a contagem da placa com maior número de colônias).
9. Verificar a produção de pigmento de *Pseudomonas* nas placas originais ou nos meios de identificação ou no Mueller Hinton.
10. Verificar a presença de colônias mucóides de *Pseudomonas*.
11. Identificar todas as colônias com crescimento significativo conforme protocolo próprio.
12. Fazer antibiograma manual de todas as bactérias significativas.
13. Encaminhar as bactérias significativas para congelamento em freezer a – 80°C.
14. Bactérias consideradas “significativas”:
  - P. aeruginosa*
  - B. cepacia*
  - S. aureus*
  - S. maltophilia*
  - H. influenzae*
  - A. xylooxidans*
  - S. pneumoniae*

H.A.P.H.M.S./2003

## ANEXO 4

### INTERPRETAÇÃO DE CULTURAS DE OROFARINGE

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná  
 Projeto: Estudo da Evolução da Colonização Bacteriana na Fibrose Cística.

CULTURA N° _____	DATA: ____/____/____
NOME DO PACIENTE: _____	Registro HC _____

**INTERPRETAÇÃO DE CULTURA DE OROFARINGE - FIBROSE CÍSTICA**

TIPOS DE COLÔNIA	ÁGAR SANGUE (Tipo de col. com contagem)	A. CHOCOLATE (Tipo de col. com contagem)	MACCONKEY (Tipo de col. com contagem)
------------------	--	---	--

COLÔNIA 1

COLÔNIA 2

COLÔNIA 3

COLÔNIA 4

<i>P. aeruginosa</i>	MUCÓIDE SIM NÃO	PIGMENTO SIM NÃO
----------------------	-----------------------	------------------------

**Resultado.:**

Bactéria 1: .....	Cont. Cols (bac.1):.....
Bactéria 2 .....	Cont. Cols (bac.2):.....
Bactéria 3 .....	Cont. Cols (bac.3):.....
Bactéria 4 .....	Cont. Cols. (bac.4):.....

1. Considerar a contagem de colônias do meio c/ contagem mais alta.
2. Relatar todos os tipos de colônia com as respectivas contagens.
3. Fazer antibiograma e identificação principalmente das bactérias abaixo.

*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
*H. influenzae*  
*B cepacia*  
*S. maltophilia*  
*A. xylosoxidans*

4. Congelar todas as bactérias significativas no freezer a -80°C.
5. Outras bactérias: consultar Helena ou Libera.

## ANEXO 5

### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

REFERÊNCIA: NCCLS. M100-S14: National Committee for Clinical Laboratory Standards: MIC Interpretive standards for *Staphylococcus* spp. p. 2004.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

Foi realizado teste de suscetibilidade por diluição em ágar, para determinação da concentração inibitória mínima das cepas de *Staphylococcus aureus* armazenadas, frente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina.

### Preparo das soluções de antibióticos:

Eritromicina, sulfato de gentamicina, oxacilina sódica monohidratada, sulfametoxazol, trimetoprim cristalino e vancomicina foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich®; ciprofloxacino foi adquirido da empresa ICN Biomedical. Foram testadas as concentrações fornecidas pela literatura (NCCLS, 2004), entre as quais encontravam-se os pontos de corte (breakpoints) para classificação das amostras nas categorias sensível (S), resistente (R) e intermediário (I) (TABELA 1). A amostra era composta de cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina (MRSA e MSSA), inicialmente classificadas pelo teste de difusão em ágar e armazenadas durante o estudo.

TABELA 1. CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE SEGUNDO O NCCLS E CONCENTRAÇÕES DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS PARA AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

ANTIBIÓTICO	PONTOS DE CORTE ( $\mu\text{g/mL}$ )		CONCENTRAÇÕES TESTADAS ( $\mu\text{g/mL}$ )
	S	R	
Ciprofloxacino	$\leq 1$	$\geq 4$	0,5 - 16
Eritromicina	$\leq 0,5$	$\geq 8$	0,25 - 32
Gentamicina	$\leq 4$	$\geq 16$	0,5 - 64
Oxacilina	$\leq 2$	$\geq 4$	0,5 - 16
Sulfametoxazol-trimetoprim	$\leq 2/38$	$\geq 4/76$	0,5/9,5 – 16/304
Vancomicina	$\leq 4$	$\geq 32$	0,25 - 16

A concentração da solução-estoque foi calculada a partir da maior concentração testada para cada antimicrobiano, do volume de ágar Mueller-Hinton utilizado nas placas e do volume final da solução-estoque (TABELA 2). A quantidade em mg do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Vol. do Solvente(ml)} \times \text{Conc. da Solução Estoque (\mu\text{g/ml})}$$

---

**Potência do antibiótico( $\mu\text{g/ml}$ )**

TABELA 2. SOLUÇÕES-ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE ( $\mu\text{g/ml}$ )	POTENCIA ( $\mu\text{g/ml}$ )	SOLVENTE UTILIZADO
Gentamicina	1.600	894	Água
Sulfametoxazol/Trimetoprim	7.600/800	1000	HCl 0.05 mol/l
Ciprofloxacina	800	1000	Água
Eritromicina	1.800	1000	Etanol 95%
Oxacilina	1.600	907	Água

As soluções de antimicrobianos foram esterilizadas por membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Millipore®), divididas em alíquotas e estocadas a 4°C, - 20°C ou - 70°C, conforme indicado.

Foram realizadas diluições seriadas a partir da solução-estoque com água ultrapura estéril (tipo Milli Q). Diluiu-se a solução-estoque até a maior concentração a ser testada, e as concentrações seguintes foram obtidas com diluições seriadas 1:2 até alcançar a menor concentração desejada.

**Preparo das placas de Mueller-Hinton ágar com antimicrobianos:**

O ágar Mueller-Hinton foi preparado com conforme instruções do fabricante. Foram distribuídas alíquotas em frascos de Castañeda estéreis. O volume distribuído em cada frasco foi de 48 ml para sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) e 49 ml para os demais antimicrobianos. Após resfriar em banho-maria até 48-50°C, foi adicionada a solução

diluída do antimicrobiano, 2 ml para SXT (1 ml de sulfametoxazol e 1 ml de trimetoprim) e 1 ml para os outros antibióticos, totalizando 50 ml, volume necessário para atingir a espessura preconizada de 4-5 mm do ágar em placas de 150mm de diâmetro. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas estéreis descartáveis. As placas foram, então, refrigeradas e utilizadas até 48 horas após o preparo.

#### **Procedimento técnico do teste de diluição em ágar:**

O inóculo bacteriano foi preparado de forma semelhante ao utilizado para o teste de suscetibilidade por disco-difusão (método de Kirby-Bauer). Na seqüência, realizou-se a diluição do inóculo até atingir a concentração final recomendada por “spot” de 5-8 mm ( $10^4$  UFC/ml). Para obter esta concentração, o inóculo inicial foi diluído 1:10 em solução salina estéril, obtendo a concentração de  $10^7$  UFC/ml. Após a inoculação no ágar Mueller-Hinton, os “spots” atingiram a concentração de cerca de  $10^4$  UFC/ml, pois os inoculadores depositam entre 1-2  $\mu$ l da amostra sobre a superfície do ágar.

Foram distribuídas alíquotas de 100  $\mu$ l do inóculo diluído em placas tipo ELISA de 96 poços. Um multiinoculador (ou replicador) de Steer com 96 pinos foi utilizado para a inoculação simultânea das amostras alíquotadas na placa. As amostras foram inoculadas inicialmente em uma placa controle sem antibiótico (FIGURA 1). Na seqüência, as placas foram inoculadas partindo da placa de menor para a de maior concentração do antimicrobiano (FIGURA 3). No final, foi inoculada outra placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a eventual contaminação e o carreamento de antimicrobianos durante o procedimento.

As placas foram mantidas em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos para secagem. Após este período as placas foram incubadas a 35°C por 16-20 horas.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano visível. A película causada pelo depósito bacteriano foi desconsiderada. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram definidos como a concentração inibitória mínima para inibir o crescimento bacteriano de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

#### **Controle de qualidade:**

Conforme recomendação do NCCLS, foi testada a cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, que forneceu resultados aceitáveis para todos os antibióticos testados (NCCLS, 2004).

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

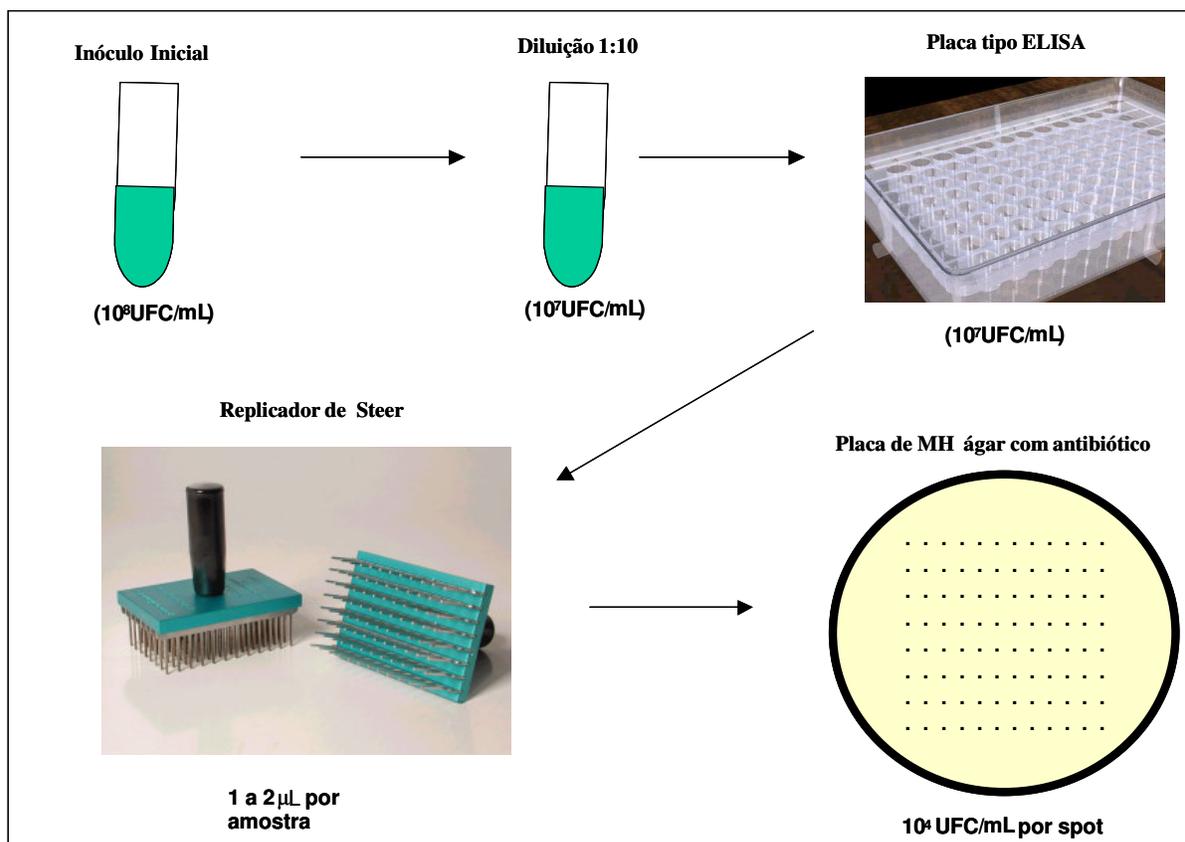
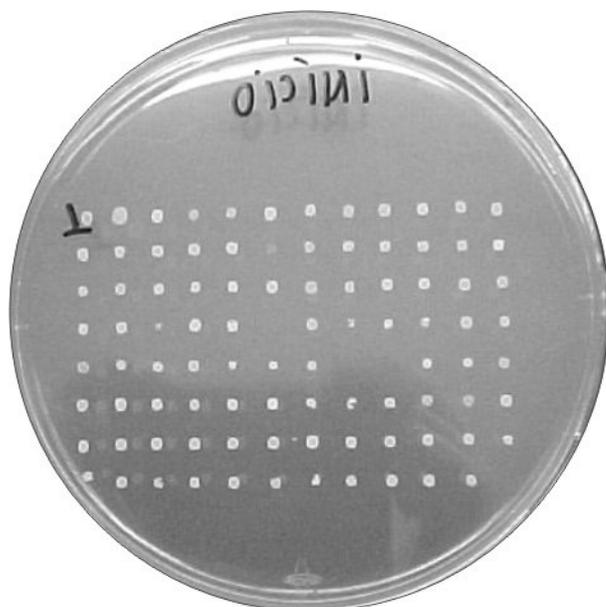
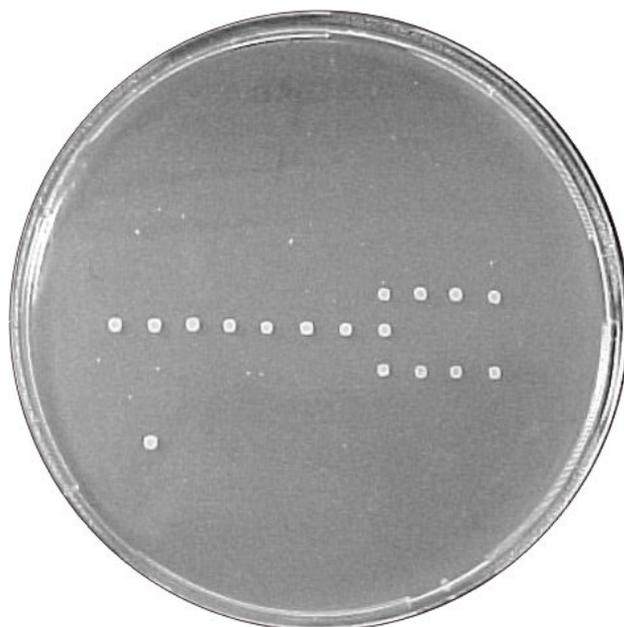


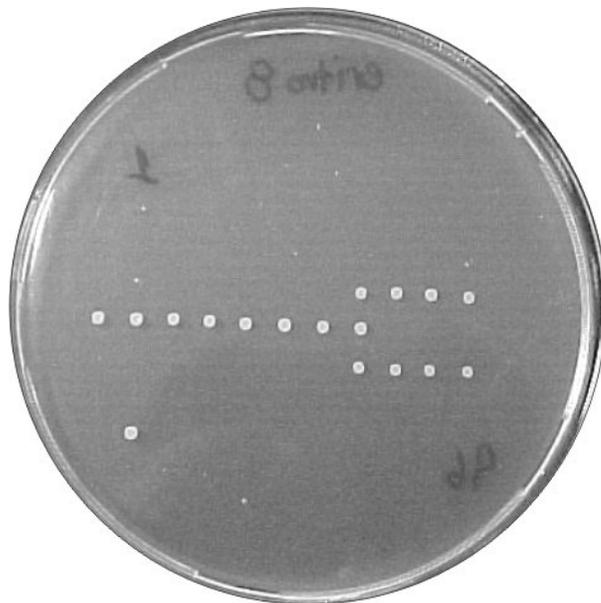
FIGURA 2 - DETERMINAÇÃO DA CIM PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR



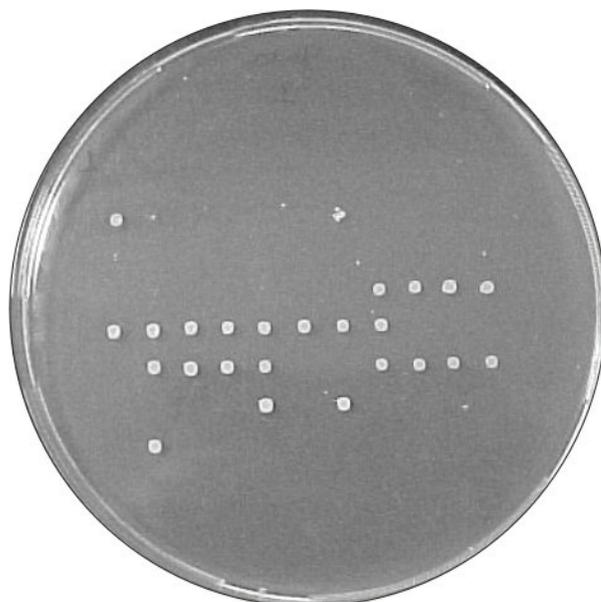
A) Placa de ágar Mueller Hinton sem antibióticos mostrando os “spots” inoculados no início do procedimento, após 18 horas de incubação, para comprovação da viabilidade dos isolados. As amostras foram numeradas de 1 a 86; os isolados correspondentes às amostras de nº 36 e 83 não apresentaram crescimento.



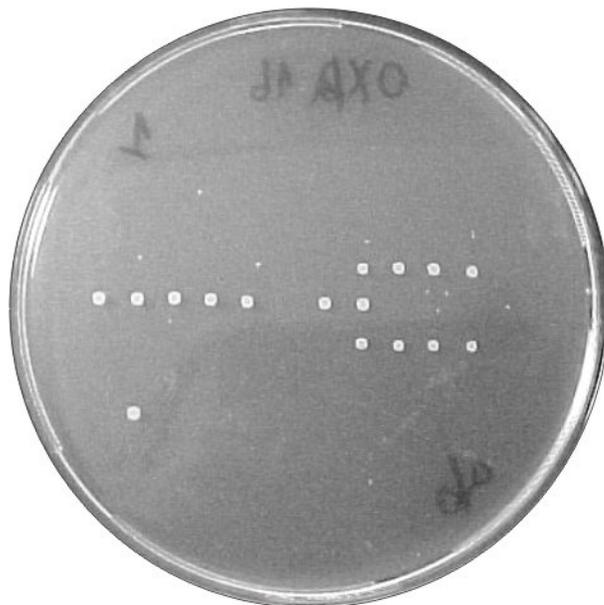
B) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 4 µg/ml de ciprofloxacino, onde somente os isolados de nº 32 a 35, 37 a 44, 56 a 59 e 74 apresentaram crescimento, sendo portanto considerados resistentes a esta concentração de ciprofloxacino.



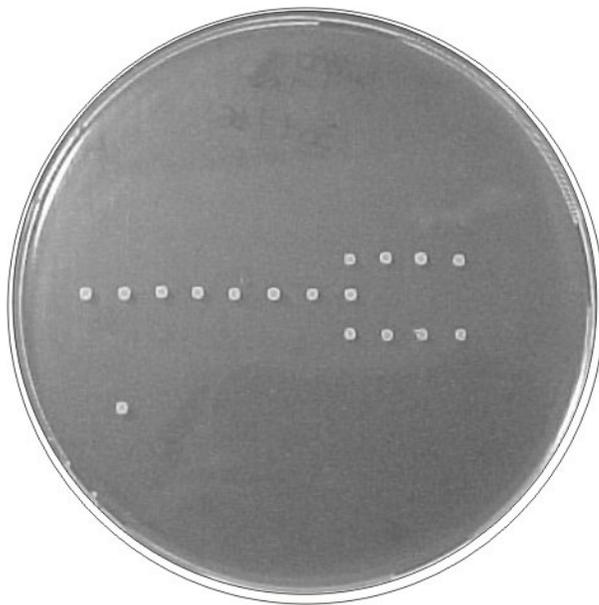
C) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 8 µg/ml de eritromicina, onde somente os isolados de nº 32 a 35, 37 a 44, 56 a 59 e 74 apresentaram crescimento, sendo portanto considerados resistentes a esta concentração de eritromicina.



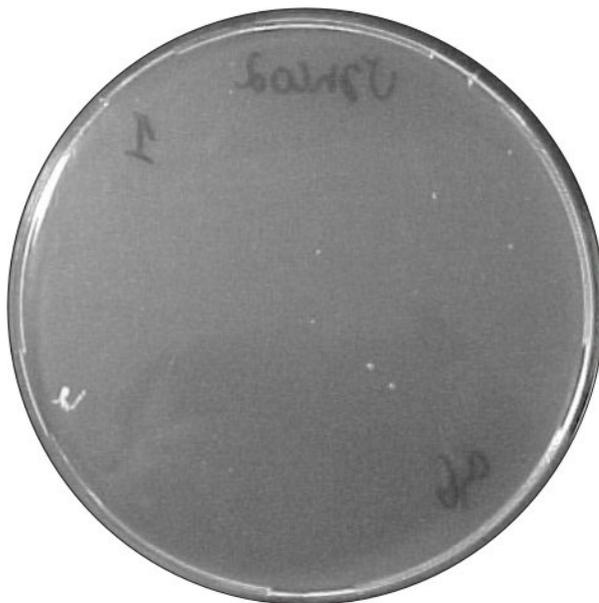
D) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 1 µg/ml de gentamicina, onde somente os isolados de nº 1, 7, 32 a 35, 37 a 44, 49 a 53, 56 a 59, 65, 67 e 74 apresentaram crescimento, sendo portanto considerados resistentes a esta concentração de gentamicina.



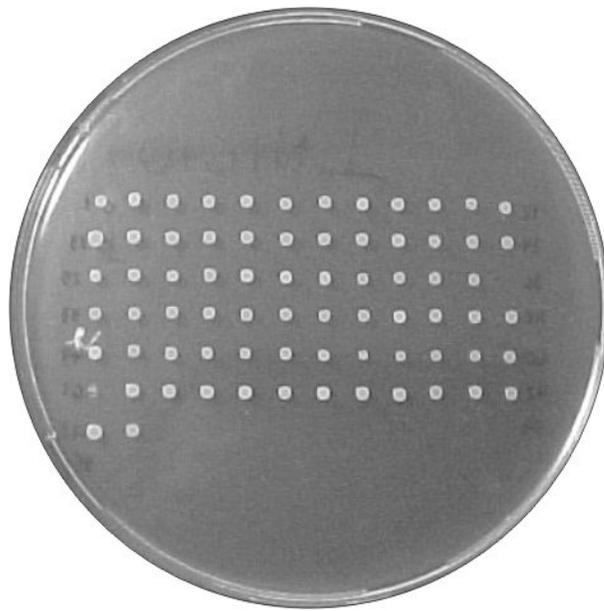
E) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 16 µg/ml de oxacilina, onde somente os isolados de nº 32 a 35, 37 a 41, 43 e 44, 56 a 59 e 74 apresentaram crescimento, sendo portanto considerados resistentes a esta concentração de oxacilina (isolados MRSA).



F) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 304 µg/ml de sulfametoxazol e 16 µg/ml de trimetoprim, onde somente os isolados de nº 32 a 35, 37 a 44, 56 a 59 e 74 apresentaram crescimento, sendo portanto considerados resistentes a esta concentração de sulfametoxazol-trimetoprim.



G) Placa de ágar Mueller Hinton contendo 2 µg/ml de vancomicina, onde todas os isolados não apresentaram crescimento, sendo portanto considerados sensíveis a esta concentração de vancomicina.



- H) Placa de ágar Mueller Hinton sem antibióticos mostrando os "spots" inoculados no final do procedimento, após 18 horas de incubação, para comprovação da viabilidade dos isolados e o não carreamento de antibióticos residuais durante a inoculação das placas com antibióticos.

ANEXO 6

ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO DE *Staphylococcus aureus* PELA TÉCNICA DE  
ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

REFERÊNCIA: SILBERT, S. **Pulsed-field gel electrophoresis**. São Paulo: Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, 2000

## **ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO DE *S. aureus* PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)**

A análise do DNA cromossômico baseia-se no princípio que existem sítios de restrição localizados na molécula do DNA. Enzimas de restrição irão reconhecer estes sítios e clivarão o DNA em fragmentos grandes. O número de fragmentos vai variar de um isolado clínico para outro. Na técnica da PFGE o DNA cromossômico é extraído e fixado em agarose. Para dissolução da parede celular bacteriana, detergentes apropriados, enzimas líticas e proteinase K são utilizados. Após extraído, o DNA é digerido com enzimas de restrição, separado por eletroforese em campo pulsado, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

### **Preparo dos blocos de agarose com o DNA das cepas de *S. aureus*:**

1. Colônias frescas (24 – 48 h de incubação) são utilizadas para o preparo do inóculo.
2. Duas a quatro colônias são inoculadas em 10ml de caldo tríptico de soja (TSB) ou caldo Mueller-Hinton (MHB) e incubadas a 37° C por uma noite, com agitação.
3. Após a incubação, as culturas em caldo são centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm. O líquido sobrenadante é aspirado e desprezado. O centrifugado é ressuspense em 1ml de salina e transferido para tubos tipo Eppendorf previamente numerados e pesados.
4. Os tubos são centrifugados na microcentrífuga por 15-30 segundos e o máximo possível de salina é aspirado.
5. O centrifugado é pesado e adicionada salina em quantidade igual (em µl) ao peso das células do centrifugado (em mg). A suspensão de células assim obtida é bem homogeneizada em “vórtex”.
6. Agarose de baixo ponto de fusão (“low melt”) é dissolvida a 2% em água destilada no microondas por 30-40 segundos e colocada em banho-maria a 58° C.
7. 10µl da suspensão de células são adicionados a 300µl de tampão EC e a mistura é homogeneizada gentilmente em “vórtex”.
8. 15µl de lisostafina são adicionados a cada tubo.
9. 340µl da agarose dissolvida são adicionados a cada tubo e bem misturados, pipetando várias vezes e rapidamente, para não solidificar.
10. A suspensão assim preparada é colocada nos moldes para blocos, cuidando para que sejam completamente preenchidos sem formação de bolhas.
11. Os moldes preparados são resfriados em refrigerador por 15 minutos.

12. 2ml de tampão EC são adicionados às cavidades das placas de microdiluição (com 6 ou 12 cavidades), identificadas de acordo com a identificação dos blocos.
13. Os blocos são cuidadosamente removidos dos moldes e colocados nas respectivas cavidades da placa de microdiluição com o tampão EC.
14. Os blocos são incubados por 5 a 12 horas a 37° C.
15. Após a incubação, o tampão EC é aspirado dos blocos, e estes são enxaguados com 5ml de tampão CHEF TE por 2 vezes, deixando de 10 a 30 minutos à temperatura ambiente.
16. O tampão CHEF TE é aspirado novamente e os blocos são observados para verificar se não estão grudados uns em cima dos outros.
17. Os blocos são cobertos com 2ml de tampão ES e 0,1ml de proteinase K em cada cavidade.
18. A placa é enrolada em filme plástico e incubada por uma noite a 50° C.
19. O tampão ES é aspirado das cavidades onde estão os blocos e as cavidades são enxaguadas com tampão CHEF TE. São realizadas mais 4 lavagens com 5ml de tampão CHEF TE à temperatura ambiente, com 1 hora de intervalo entre cada lavagem.
20. As placas são enroladas em filme plástico e armazenadas a 5° C até o momento da digestão (os blocos podem ficar armazenados em tampão CHEF TE a esta temperatura por meses, se necessário).

#### **Digestão do DNA das cepas de *S. aureus* com enzimas de restrição:**

1. São colocados 300µl de tampão DNS nas cavidades de uma placa de microdiluição, de acordo com o número de blocos a ser digerido.
2. Os blocos são cortados no tamanho apropriado, de acordo com o tamanho do pente e do aparelho de PFGE usado.
3. O tampão DNS é removido assim que o último bloco é colocado na placa, e substituído por tampão DNS fresco. Segue-se incubação à temperatura ambiente por 1 hora.
4. Esta lavagem é repetida por 4 vezes, trocando o tampão DNS a cada hora.
5. O tampão DNS é substituído por 50µl do tampão de enzima de restrição sem enzima e segue-se incubação por 1 hora a 5° C.
6. O tampão sem enzima é substituído por 50µl do mesmo tampão com a enzima de restrição (*Sma*I).
7. Os blocos são inspecionados para assegurar que todos estejam mergulhados no tampão com a enzima. A placa é então enrolada em filme plástico e incubada por 1-2 horas a 5° C.
8. Segue-se incubação por 12 a 20 horas à temperatura recomendada pelo fabricante da enzima.

### **Preparo do gel de agarose:**

1. Para a eletroforese, junto com os blocos preparados com o DNA bacteriano, deve ser corrido o marcador de peso molecular (PM) "lambda DNA ladder".
2. O marcador de PM é cortado no tamanho dos blocos e coberto com 3ml de tampão 0,5 X TBE.
3. O tampão é removido imediatamente e substituído por tampão 0,5 X TBE fresco. Esta lavagem é repetida por 4 ou 5 vezes até completar 2 horas de lavagem.
4. A agarose é preparada de acordo com a quantidade e o tamanho dos géis, e aquecida em microondas até dissolução (com o frasco coberto para impedir a evaporação). Depois de dissolvida é resfriada em banho-maria a 58-60° C.
5. O molde do gel é montado numa bancada reta e nivelada. O pente é preso na barra de acrílico, deixando um espaço de 1-2mm entre o final do pente e o molde do gel.
6. O pente é ajustado horizontalmente entre duas estantes pequenas e os blocos, incluindo os marcadores de PM, são colocados na ponta dos dentes do pente e na ordem com que serão corridos no gel.
7. O excesso de líquido dos blocos é removido com pipeta ou papel filtro.
8. Os blocos são presos no pente pingando-se uma gota de agarose sobre cada um deles. Espera-se solidificar por aproximadamente 10 minutos.
9. O pente é cuidadosamente virado com os blocos presos na posição vertical e colocado sobre o molde, em uma das extremidades do gel.
10. Agarose dissolvida é distribuída cuidadosamente com pipeta por sobre o molde, começando pela extremidade oposta do pente, o mais longe possível dos blocos.
11. O gel é deixado solidificar por aproximadamente 30 minutos, quando então é cuidadosamente removido o pente e os blocos examinados para ver se ficaram presos nos espaços vazios do gel.
12. Os espaços vazios do gel onde estão os blocos são preenchidos com agarose.

### **Corrida do gel de agarose:**

1. A cuba do aparelho é nivelada e preenchida com 1.900ml de água destilada e 100ml de tampão 10 X TBE, bem espalhado por toda a cuba.
2. O aparelho é ligado na unidade principal.
3. A bomba é ligada e observado se o termômetro está bem posicionado dentro da cuba.
4. O resfriador é ligado e ajustado à temperatura apropriada para a corrida.

5. O gel é cuidadosamente colocado na cuba, retirando todas as bolhas que se formarem embaixo do gel.
6. A tampa da cuba é colocada, assegurando-se que a mesma esteja bem fechada.
7. O gel é deixado equilibrar-se no aparelho por 30-60 minutos.
8. O aparelho é ajustado quanto ao tempo inicial, o tempo final, o tempo de corrida e a voltagem.
9. A corrida é iniciada apertando o botão *start* do aparelho.
10. Após uma hora de corrida a cuba é inspecionada quanto à temperatura, a corrente e a formação de bolhas.
11. Após terminada a corrida o aparelho é desligado na ordem inversa: resfriador, bomba e aparelho principal.
12. O gel é cuidadosamente retirado do aparelho e colocado em uma cuba de vidro com tampa para corar, adicionando-se 250ml de água destilada e 20 $\mu$ l de brometo de etídio.
13. Após uma hora à temperatura ambiente, a solução de brometo de etídio é recolhida num galão para descarte e o gel é enxaguado com água destilada.
14. O gel é coberto com água destilada e deixado “descorando” por mais uma hora.
15. O gel é então finalmente visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

ANEXO 7

ARTIGO PARA SUBMISSÃO A REVISTA INDEXADA  
(JORNAL DE PEDIATRIA)

## **ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA NA FIBROSE CÍSTICA, COM ÊNFASE EM *Staphylococcus aureus*.**

Helena A. P. Homem de Mello de Souza<sup>1</sup>; Keite da Silva Nogueira<sup>1</sup>; Carlos A. Riedi<sup>2</sup>; Ricardo da Paz Vieira<sup>3</sup>; Libera Maria Dalla Costa<sup>4</sup>; Néelson A. Rosário<sup>5</sup>.

1. Mestrandas, Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas, UFPR.
2. Mestre, Departamento de Pediatria, UFPR.
3. Estatístico, Departamento de Estatística, UFPR.
4. Doutora, Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas, UFPR.
5. Doutor, Professor Titular do Departamento de Pediatria, UFPR.

A fibrose cística (FC) é a doença genética fatal mais freqüente que acomete a raça branca, especialmente de ascendência européia. A inclusão da pesquisa do defeito genético responsável pela doença no programa de triagem neonatal (teste do pezinho), em setembro de 2.001, trouxe à tona diversos casos que provavelmente seriam diagnosticados após anos de tratamento sem sucesso de infecções pulmonares recorrentes. O uso de antibióticos profiláticos comprovadamente retarda a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, a bactéria mais comum na infecção brônquica e que afeta cedo ou tarde todos os pacientes com FC. A causa de óbito desses pacientes é, quase invariavelmente, a infecção e a inflamação provocadas pela bactéria. Alguns autores têm levantado a hipótese de que a infecção por *Staphylococcus aureus* proporciona um *milieu* favorável à aderência e à instalação de *P. aeruginosa* nas vias aéreas dos pacientes com FC, e que a antibioticoprofilaxia dirigida a *S. aureus* terminaria por retardar a colonização por aquela bactéria. Até o presente momento, poucos estudos longitudinais foram relatados sobre a colonização e a dinâmica da infecção com *S. aureus* em pacientes com FC.

Com o objetivo de observar a evolução da colonização bacteriana das vias aéreas das crianças com FC diagnosticadas através do programa de triagem neonatal, foram realizadas culturas de material de orofaringe, coletadas em todas as visitas de acompanhamento clínico rotineiro em ambulatório específico do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo período de um ano.

### **MÉTODOS**

Foram coletados swabs de faringe posterior de crianças com fibrose cística, diagnosticadas como portadoras da doença pela triagem neonatal (teste do pezinho), e confirmação através do teste do suor. As coletas ocorreram obedecendo-se a frequência de atendimento estabelecida de acordo com a evolução clínica de cada paciente; desta forma, o intervalo entre as consultas variou de 15 dias a três meses, com média de 53 dias. Foi coletado um total de 234 amostras, com uma média aproximada de 9 por paciente. Foram incluídos no estudo todos os pacientes atendidos regularmente no ambulatório citado, pelo período de um ano, com início em 25 de agosto de 2.003 e término em 6 de dezembro de 2.004, totalizando 25 pacientes.

O material biológico (swab) foi transportado em tubos com 1 ml de tampão PBS contendo 0,1% de gelatina bacteriológica, em caixa de isopor (1). Na chegada do material ao laboratório, as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 30 segundos, e inoculadas com alça calibrada de 10 µl (0,01ml) em três placas com diferentes meios de cultura: ágar-sangue (AS), ágar chocolate suplementado (ACH) e ágar MacConkey (MC), de maneira a propiciar avaliação semi-quantitativa do crescimento bacteriano (2). As placas foram incubadas à temperatura e atmosfera usuais.

As colônias suspeitas das bactérias classicamente isoladas nesta população de pacientes, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* foram identificadas utilizando os métodos de rotina da Seção de Bacteriologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR (3, 4). Os mesmos isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade pelo método clássico de disco-difusão (Kirby Bauer) (5). Para *S. aureus* foram testados cefoxitina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, e vancomicina, além do teste de triagem para resistência à oxacilina de todos os isolados pelo método da placa de triagem com aquele antibiótico (6, 7). Foi realizada pesquisa de beta-lactamase nos isolados de *H. influenzae* pelo método do disco com cefalosporina cromogênica (Nitrocefim®) (8). Cada morfotipo diferente (mucóide e não-mucóide) de *P.aeruginosa* foi testado separadamente pelo método de Kirby-Bauer e a interpretação realizada após 24 horas completas de incubação (9). As demais bactérias isoladas foram testadas pelo método tradicional ou pelo método automatizado (Vitek – BioMérieux). As amostras bacterianas de interesse foram suspensas em solução para criopreservação (caldo infuso de cérebro e coração com 15% de glicerol) e armazenadas a -80°C para testes complementares que seriam realizados em conjunto, posteriormente (10). Foram realizados testes

confirmatórios para a identificação definitiva de *S. aureus* após reativação dos isolados armazenados: hemólise em ágar-sangue de carneiro, prova da coagulase ligada, crescimento em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, fermentação do manitol, pigmentação das colônias e atividade da desoxirribonuclease, seguindo técnicas padronizadas (11).

Foi realizado o teste de suscetibilidade por concentração inibitória mínima de todos os isolados de *S. aureus* armazenados, pelo método de diluição em ágar, frente a diferentes concentrações de ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina (12). Sessenta e cinco isolados foram encaminhados ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), em São Paulo, para tipagem molecular pelo método da eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) (13).

## RESULTADOS

Foram coletadas 234 amostras de orofaringe de um total de 25 crianças no período de 25 de agosto de 2.003 a 13 de dezembro de 2.004, numa média de 9,3 amostras por paciente. A distribuição dos pacientes quanto ao sexo foi de 48% do sexo masculino e 52% do sexo feminino. Os pacientes analisados tinham uma média de idade de 14,3 meses para os meninos e 15,5 meses para as meninas (média 15 meses). As contagens de colônias variaram na ordem de 1 a 100 UFC, portanto não foram consideradas devido à pequena variação. As bactérias de interesse para a população estudada, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e *B. cepacia* foram isoladas em 100 amostras (42,73%), nas proporções apresentadas na **tabela 1**.

O primeiro patógeno a ser isolado dos pacientes foi *S. aureus* em 18 amostras, e *H. influenzae* em 6 amostras, sendo que em 4 delas estes dois patógenos foram isolados concomitantemente na primeira cultura positiva. *P. aeruginosa* foi o primeiro patógeno a ser isolado em somente dois pacientes, sendo que em um deles foi isolado concomitantemente *S. aureus* na primeira cultura positiva.

*S. aureus*: dos 19 pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidos 73 isolados, sendo que, destes, 18 eram oxacilina-resistentes (24,6%). Três pacientes apresentaram MRSA, sendo que dois deles tiveram quase a totalidade dos isolados com esta característica (13/14 e 4/6) e um outro paciente teve apenas um isolado em um total de três. Os dois primeiros pacientes citados foram internados por várias vezes durante o estudo. Dos 19 pacientes, seis estavam persistentemente colonizados. A maior taxa de amostras positivas

por paciente foi verificada com esta bactéria (37,23%, com variação 10 a 82,35%). O tempo médio decorrido até o primeiro isolamento foi de 214 dias, com um intervalo de confiança de 120 a 309 dias.

*P. aeruginosa*: dos nove pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidos 15 isolados, sendo que todos eram multi-sensíveis e não-mucóides. Do total de nove pacientes, seis foram anteriormente colonizados com *S. aureus*, e um com *H. influenzae*. Nenhum paciente foi colonizado persistentemente com *P. aeruginosa*, e em nenhum deles *P. aeruginosa* foi o primeiro patógeno a ser isolado. Das amostras positivas para *P. aeruginosa*, em uma foi isolado concomitantemente *Haemophilus* spp., em outra MRSA, em outra MSSA, em outras duas *Haemophilus* spp. e MSSA, e em 8 amostras não foi isolado outro patógeno. A média de amostras positivas por paciente foi de 15,6% com um intervalo de confiança de 0 a 43,5%, e o tempo médio decorrido até o primeiro isolamento foi de 358 dias, com um intervalo de confiança de 164 a 553 dias.

*Haemophilus* spp.: dos 19 pacientes colonizados com esta bactéria foram obtidos 33 isolados, sendo que 28 foram testados para produção de beta-lactamase. Oito eram produtores da enzima (28,6% dos isolados testados) e 20 não. Nenhum paciente foi colonizado persistentemente com *Haemophilus* spp. A média de amostras positivas por paciente foi de 18,7%, com um intervalo de confiança de 0 a 37,5%.

*B. cepacia*: foram obtidos 2 isolados de um mesmo paciente, em amostras consecutivas, com contagens baixas (20 UFC nas 2 amostras) e os dois eram multi-sensíveis. O paciente era colonizado persistentemente com MRSA, e não apresentou *B. cepacia* nas culturas subsequentes.

Não foram isolados *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes xylosoxidans* nas amostras estudadas.

Foram analisados 69 isolados clínicos de *S. aureus* quanto ao perfil bioquímico (biotipo) e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (antibiotipo). De 18 pacientes colonizados, 4 tinham apenas um isolado cada, e portanto não foram incluídos nesta análise preliminar. Dos demais, 10 apresentaram mais da metade dos seus isolados com biotipos e antibiotipos que sugeriam tratar-se do mesmo clone, e outros 4 tinham isolados com perfis diferentes, seja quanto ao biotipo ou ao antibiotipo.

Sessenta e cinco amostras de *S. aureus* foram encaminhadas ao LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina, em São Paulo, SP, para tipagem molecular pelo

método da eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE). Os isolados de MRSA foram comparados com o clone brasileiro de MRSA na mesma análise. Foram obtidos ao total 21 perfis eletroforéticos distintos.

Os isolados de MRSA obtidos de dois pacientes (10 de um paciente e 3 do outro) apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro. Um outro isolado de MRSA pertencente a um paciente como isolado único, mostrou ser distinto. Os demais isolados, todos de MSSA, distribuíram-se entre 18 perfis eletroforéticos comparando-se as amostras de um mesmo paciente (**Figura 1**).

A determinação das CIM dos antibióticos testados frente aos isolados de *S aureus* demonstrou que todos apresentaram elevada potência, com CIM<sub>50</sub> abaixo dos pontos de corte para sensibilidade, porém a vancomicina foi o mais ativo, com CIM<sub>90</sub> também abaixo deste valor, enquanto os outros antimicrobianos testados apresentaram valores acima do ponto de corte para resistência (**Tabela 2**). Analisando-se as sensibilidades, a vancomicina foi o antimicrobiano com maior número de cepas sensíveis (100%), com os outros agentes apresentando sensibilidades que variaram de 64,2 a 76,1%.

## DISCUSSÃO

A fibrose cística é causada por mutações no gene *CFTR* que, por alterações na viscosidade do muco das vias aéreas dos indivíduos afetados, induz à infecção endobrônquica crônica que será ao final responsável pela evolução fatal de praticamente todos os pacientes. Somente um número limitado de espécies bacterianas pode ser responsabilizado por estas infecções, entre elas *S. aureus* e *H. influenzae* em crianças, e *P. aeruginosa* em adolescentes e adultos (14). A população de pacientes observada no presente estudo compreende crianças na primeira infância, variando de um mês a 3 anos de idade. O esperado era, portanto, que a maioria dos colonizados fosse por *S. aureus* e *H. influenzae*, o que veio a se confirmar pelo isolamento de *S. aureus* em 19 dos 25 pacientes (76% do total). *Haemophilus* spp. foi também isolado na mesma proporção de indivíduos, embora em um número menor de amostras por paciente (18,7% contra 41,8% dos pacientes com *S. aureus*).

A persistência de *S. aureus* há muito vem sendo relatada em infecções crônicas de pacientes jovens com FC. Hoiby, em 1982, relatou a incidência de *S. aureus* em 20% de todas as exacerbações pulmonares de pacientes FC (15). Um estudo recente determinou a duração e a dinâmica da persistência de *S. aureus* nas vias

aéreas de pacientes FC em um período de 6 anos. A média de idade dos pacientes foi de 9,5 anos no início do estudo (variando de 1 a 33) e 14,5 anos no final. Foram analisadas amostras de escarro e orofaringe, e foi considerada infecção persistente por *S. aureus* quando isolado por mais de 6 meses (16). O tempo médio de persistência foi de 37 meses, variando de 6 a 70 meses. O perfil eletroforético por PFGE identificou 6 clones prevalentes, isolados de mais de um paciente, e 39 clones individuais, isolados de pacientes diferentes. A maioria dos pacientes apresentava clones únicos. Embora tendo estudado uma população diferente quanto à idade e ao tipo de amostras coletadas, o presente estudo é semelhante, tendo em vista os objetivos e a metodologia utilizada. Os isolados de MSSA analisados pelo mesmo método indicaram que um único clone persistia no paciente ao longo do estudo, e que, comparando-se os isolados de todos os pacientes, diferentes clones estavam presentes.

O significado clínico da infecção por MRSA na FC ainda não foi estabelecido. Um estudo recente analisou crianças com a doença durante um período de 7 anos cujas culturas de secreções respiratórias revelaram a presença de MRSA (17). Os autores concluíram que a infecção por esse tipo de bactéria em crianças com FC não afeta significativamente a função respiratória, mas tem um efeito adverso no crescimento. Os pacientes requerem antibióticos intravenosos em quantidade significativamente maior e têm um raio X pior que os controles. Em nosso estudo, apenas duas crianças apresentaram infecção persistente com MRSA, com quase a totalidade dos isolados com este fenótipo. Os dois pacientes provavelmente adquiriram a bactéria nas internações a que foram submetidos por várias vezes. Estes pacientes apresentaram curvas de ganho de peso constantemente abaixo do percentil 2,5, o que pode ser comparado aos dados de Miall e colaboradores, embora nossa amostragem tenha sido bem menor (2 pacientes *versus* 14 pacientes no estudo citado). O paciente que apresentou MRSA por mais tempo tinha uma função pulmonar persistentemente ruim durante todo o período do trabalho, enquanto o outro teve um quadro de íleo meconial, necessitando de cirurgia logo nos primeiros meses de vida. Os isolados de MRSA obtidos de dois pacientes (10 de um paciente e 3 do outro) apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro. Estes pacientes foram internados por diversas vezes. Um outro isolado de MRSA pertencente a um paciente como isolado único (somente uma amostra em todo o estudo), demonstrou ser distinto do clone brasileiro. Este paciente nunca foi internado. Os demais isolados, todos de MSSA, distribuíram-se entre 18 perfis

eletroforéticos; considerando-se a identidade ou similaridade quando comparadas as amostras entre si para um mesmo indivíduo, verificou-se que a mesma cepa persistiu colonizando o paciente durante o período do estudo.

O grupo de Ramsey publicou recentemente um estudo longitudinal abordando as alterações fenotípicas e genotípicas em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de orofaringe e lavado broncoalveolar (LBA) de crianças pequenas com FC, em um coorte de 40 pacientes durante os 3 primeiros anos de vida. Cepas isoladas precocemente apresentavam um fenótipo distinto das cepas comuns de FC: geralmente não-mucóides e sensíveis a antimicrobianos (19). Nossos resultados foram semelhantes, embora com uma incidência bem menor de *P. aeruginosa*. Apenas 36% dos pacientes apresentaram este patógeno nas culturas, com nenhum dos pacientes sendo colonizado persistentemente; os isolados foram todos multissensíveis e não-mucóides.

*H. influenzae* está freqüentemente envolvido em infecções pulmonares crônicas e exacerbações agudas de pacientes com FC, principalmente crianças na primeira infância. A bactéria é geralmente não-tipável, o que é característica das cepas isoladas de pacientes com outras doenças respiratórias crônicas. A produção de  $\beta$ -lactamase tem sido observada em até 20% dos pacientes FC, com variações de um centro para o outro (20). Em um estudo recente realizado na Espanha a maioria dos pacientes apresentou colonização crônica com múltiplos clones da bactéria (21). O nosso estudo não detectou persistência de colonização por *Haemophilus* spp, embora a discrepância na freqüência desta bactéria pode ser devida ao método usado para o seu isolamento de amostras respiratórias (22). O supercrescimento de bactérias da microbiota da orofaringe, especialmente estreptococos do grupo “viridans”, pode dificultar a visualização das colônias transparentes e pequenas de hemófilos, especialmente se não for utilizado um meio com enriquecimento específico para o seu crescimento, como o suplemento VX. Das 28 amostras testadas para produção de  $\beta$ -lactamase, 8 apresentaram-se produtoras da enzima, ou seja 28%, algo superior ao observado no estudo espanhol.

Os resultados observados no presente estudo permitiram concluir que: *Staphylococcus aureus* foi o primeiro patógeno isolado e a bactéria de maior ocorrência na população estudada; também foi a bactéria com maior número de amostras positivas por paciente. Os isolados de *Staphylococcus aureus* testados mostraram-se sensíveis a ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina, porém o agente mais ativo foi vancomicina, com 100% de sensibilidade. A freqüência de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA) na população estudada é preocupante devido à possibilidade de disseminação a outros pacientes com FC. As cepas de MRSA foram provavelmente

adquiridas por infecção cruzada no ambiente hospitalar, visto apresentarem perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro descrito por Sader, em 1994. As cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis são policlonais e exclusivas de cada paciente, indicando que provavelmente foram adquiridas dentro do círculo social próprio. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, não-persistentes e com fenótipos não-mucóides e multissensíveis, pressupõem que a infecção é intermitente e não crônica. Há necessidade de se pesquisar anticorpos específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* em crianças pequenas devido à baixa sensibilidade das culturas de orofaringe quanto ao isolamento desta bactéria. A colonização por *Haemophilus* spp. foi transitória, com baixo número de amostras positivas por paciente. A incidência de isolados produtores de  $\beta$ -lactamase na população estudada foi alta. A metodologia utilizada para o processamento das amostras foi adequada e pode ser recomendada para uso rotineiro nos laboratórios de microbiologia clínica. Para amostras de pacientes que fizeram ou fazem uso de sulfametoxazol-trimetoprim é necessário acrescentar uma placa de ágar manitol-salgado para inoculação inicial. Nas crianças colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa* é recomendável a pesquisa de *Burkholderia cepacia* através do uso de meio seletivo apropriado. Bactérias emergentes como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes xylosoxidans* não são frequentes nesta população. Futuramente a continuidade deste estudo poderá fornecer subsídios para a verificação do papel de *Staphylococcus aureus* na patogênese da infecção pulmonar crônica dos pacientes diagnosticados pela triagem neonatal.

**Tabela 1:** RESULTADOS DO TESTE DE PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA AS BACTÉRIAS DE INTERESSE EM FC, POR PACIENTE.

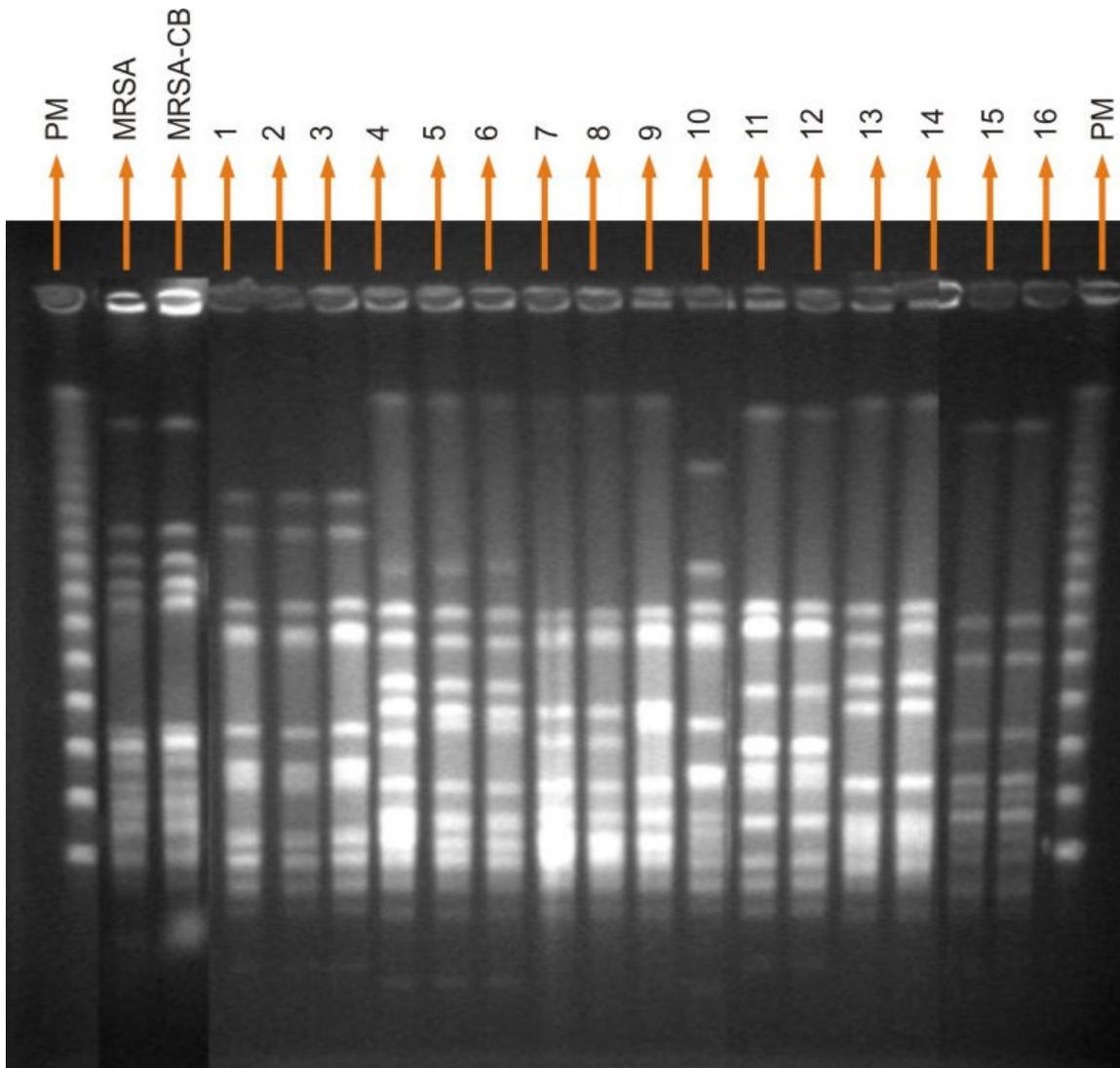
BACTÉRIA	AMOSTRAS POSITIVAS	PROPORÇÃO (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	73/234	39,67	16,1 - 63,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15/234	15,6	0 - 43,5
<i>Haemophilus influenzae</i>	33/234	18,7	0 - 37,6

**Tabela 2:** SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E VALORES DE CIM<sub>50</sub> E CIM<sub>90</sub> DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS.

ANTIBIÓTICO	PONTOS DE CORTE	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	% SENSI-BILIDADE
Ciprofloxacino	S≤1; R≥4	< 0,5	> 16	73,5
Eritromicina	S≤0,5; R≥8	< 0,25	> 32	68,6
Gentamicina	S≤4; R≥16	< 1,0	> 64	64,2
Oxacilina	S≤2; R≥4	< 0,5	> 16	75,0
Sulfametoxazol-trimetoprim	S≤2/38; R≥4/76	< 19/1,0	> 304/16	76,1

Vancomicina	$S \leq 4$ ; $R \geq 32$	< 0,5	< 0,5	100,0
-------------	--------------------------	-------	-------	-------

**Figura 1:** perfis eletroforéticos dos isolados de *Staphylococcus aureus*



OBS.: PM = marcador de peso molecular; MRSA = padrão das amostras de MRSA isoladas; MRSA-CB = clone brasileiro de MRSA; 1 a 20 = perfis de amostras de MSSA isoladas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL, et al. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(2):331-7.
2. Koneman EW; Allen, SD; Janda, WM; Schreckenberber, PC; Winn Jr., WC. Técnicas para o cultivo de amostras. In: *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido - 5ª Edição*. Rio de Janeiro, RJ: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda.; 2001. p. 97-99.
3. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press; 2003.
4. York MK. Aerobic Bacteriology. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd. Ed. Washington, DC: ASM Press; 2004. p. 3.1.1. - 3.18.2.1.
5. Jorgensen JHT, J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 1108-1127.
6. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10):3781-4.
7. Bethel CD; Boonlayangoor S. Oxacillin salt-agar screen test to detect oxacillin (methicillin)-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd Edition. Washington, DC: ASM Press; 2004. p. 5.4.1-5.4.4.
8. Bethel CD; Boonlayangoor S. Beta-lactamase tests. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd Edition. Washington, DC: ASM Press; 2004. p. 5.3.1-5.3.6.
9. Thomassen MJ, Demko CA, Boxerbaum B, Stern RC, Kuchenbrod PJ. Multiple of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1979;140(6):873-80.
10. Reimer LG; Carroll K.C. Procedures for the storage of microorganisms. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 67-73.
11. Bannerman TM. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 384-404.
12. NCCLS. M100-S14. In: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004. p. MIC Interpretive standards for *Staphylococcus* spp.
13. Silbert S. Pulsed-field gel electrophoresis. *Procedimento Operacional Padrão*. São Paulo, SP: Laboratório Especial de Microbiologia Clínica; 2000.
14. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):158-63.
15. Hoiby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1982;301:33-54.
16. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9):4424-7.
17. Miall LS, McGinley NT, Brownlee KG, Conway SP. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 84(2):160-2.
18. Shwachman HK, L.L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1958; 96(7):6-15.
19. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183(3):444-52.
20. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1):35-51.
21. Roman F, Canton R, Perez-Vazquez M, Baquero F, Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4):1450-9.
22. Barth ALP, T.L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Infect Dis* 1998; 2(2):43-61.