

Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórios de fibrocísticos do Recife

Primeira submissão em 30/06/03
Última submissão em 16/02/04
Aceito para publicação em 22/03/04
Publicado em 20/08/04

Prevalence of potentially pathogenic bacteria in respiratory specimens of cystic fibrosis patients from Recife

Marcelo Magalhães¹; Murilo C. A. de Britto²; Patrícia G. M. Bezerra³; Adelmá Veras⁴

unitermos	resumo
Fibrose cística	Entre 147 espécimes respiratórios (114 escarros e 33 swabs faríngeos) coletados de 36 portadores de fibrose cística durante consultas de rotina ou na exacerbação de seus sintomas respiratórios, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2002, isolaram-se: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (65,3%), <i>Staphylococcus aureus</i> (29,9%), <i>Burkholderia cepacia</i> (29,2%) e <i>Haemophilus influenzae</i> (20,4%). Entre os isolados de <i>S. aureus</i> e <i>H. influenzae</i> , 6,8% foram resistentes à oxacilina e 6,7% foram produtores de β-lactamase, respectivamente. Das 96 linhagens de <i>P. aeruginosa</i> encontradas, 59,4% foram do fenótipo mucóide. Em 12 espécimes, ambos os biótipos, mucóide e não-mucóide, estiveram presentes. Bactérias gram-negativas emergentes, tais como <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , foram isoladas em pequeno número. Com exceção do <i>H. influenzae</i> , mais freqüente nas crianças entre seis e 12 anos, não se encontrou diferença entre espécie bacteriana isolada e grupo etário.
Infecções respiratórias	
Bacteriologia pulmonar	

abstract key words

Of 147 respiratory specimens (114 sputum and 33 pharyngeal swabs) collected from 36 cystic fibrosis patients during routine visits or exacerbation of their respiratory symptoms, from December 2000 to December 2002, the following bacterial species were recovered: *Pseudomonas aeruginosa* (65.3%), *Staphylococcus aureus* (29.9%), *Burkholderia cepacia* (29.2%), and *Haemophilus influenzae* (20.4%). Among the *S. aureus* and *H. influenzae* isolates, 6.8% were oxacillin resistant and 6.7% were β-lactamase producers, respectively. Of 96 isolates of *P. aeruginosa*, 59.4% belonged to the mucoid phenotype. Both mucoid and non-mucoid morphotypes were simultaneously found in 12 specimens. Emerging gram-negative bacteria, such as *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter xylosoxidans*, were present at a low number. *H. influenzae* was more prevalent in the cystic fibrosis children between six and 12 years old. Concerning the other bacterial species there was not preference for age groups.

Cystic fibrosis
Respiratory infections
Pulmonary bacteriology

1. Ex-professor titular de Microbiologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco.

2. Doutor em Saúde Pública; médico do Serviço de Doenças Respiratórias do Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP).

3. Mestre em Pediatria; coordenadora do Serviço de Doenças Respiratórias do IMIP.

4. Médica microbiologista do Laboratório Marcelo Magalhães.

Introdução

Fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva resultante de mutação no gene regulador do transporte do íon cloro através das membranas epiteliais⁽²¹⁾. No aparelho respiratório, ocasiona espessamento das secreções, o que dificulta o movimento mucociliar. Isso propicia infecções crônicas recorrentes, bronquiectasias e progressivo declínio da função pulmonar, com *cor pulmonale* e óbito^(19, 23).

Apesar da grande susceptibilidade, a árvore respiratória dos portadores de FC é geralmente colonizada ou infectada por variedade relativamente pequena de espécies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e membros do complexo *Burkholderia cepacia*^(10, 22). Esse complexo é um grupo taxonômico ainda em crescimento, incluindo, na atualidade, nove diferentes espécies ou variedades genômicas^(3, 17). Nos últimos anos, entretanto, outros microrganismos, especialmente gram-negativos não-fermentadores da glicose, vêm sendo apontados como capazes de colonizar a árvore respiratória de portadores de FC^(2, 11, 22).

Neste estudo relata-se a prevalência de espécies bacterianas potencialmente patogênicas encontradas em espécimes respiratórios, escarro e *swabs* faríngeos de fibrocísticos do Recife.

Material e método

Participantes

Foram incluídos no estudo 147 espécimes respiratórios, 114 escarros e 33 *swabs* faríngeos, coletados de 36 portadores de fibrose cística durante consultas de rotina ou na exacerbação de seus sintomas respiratórios, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2002. O número de espécimes fornecido por cada paciente variou amplamente, de um a 12, mediana de quatro. Os portadores de FC foram previamente diagnosticados através de dosagem de cloreto no suor⁽⁶⁾ e/ou método molecular, pelo teste da reação em cadeia da polimerase (PCR), realizado pela Dra. Mayana Zatz, Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram acompanhados no Serviço de Doenças Respiratórias do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP). A idade variou entre 0,7 e 28 anos, com mediana de dez anos. Os participantes ou seus responsáveis foram orientados conforme o protocolo da instituição: comparecer ao ambulatório a cada três meses, ou quando houvesse exacerbação da infecção respiratória. Entretanto,

por motivos diversos, as consultas ocorreram a intervalos variáveis, o que se refletiu na discrepância entre o número de espécimes examinados por paciente.

A cada consulta, como parte do protocolo de atendimento, coletou-se uma amostra de escarro em frasco esterilizado. Nos pacientes incapazes de fornecer escarro, coletou-se secreção faríngea com a ajuda de um *swab* de haste de madeira com ponta de poliéster, acondicionado após a coleta em meio de Stuart.

Os espécimes foram enviados em seguida ao Laboratório Marcelo Magalhães, em caixas térmicas sob resfriamento.

Isolamento bacteriano

Aproximadamente 0,5ml da porção purulenta do escarro foi adicionada a 1ml de solução salina estéril, em tubo de ensaio, e homogeneizada em agitador durante 30s. Apenas os escarros que ao exame microscópico, após coloração de Gram, mostraram pelo menos 75% de leucócitos polimorfonucleares em relação a células epiteliais pavimentosas foram considerados. O homogeneizado foi então inoculado consecutivamente com a ajuda de uma alça de aço-níquel de 1µl em duas placas de Petri contendo ágar sangue de carneiro (ASC), uma placa contendo ágar chocolate (ACH) suplementado com 0,1% de extrato de levedo (Oxoid) e com 20µg/ml de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma), uma placa contendo o meio ágar eosina azul de metileno (EMB) e uma última contendo meio seletivo para "*B. cepacia*" (BCSA)⁽⁸⁾. Uma das placas de ASC e a de ACH foram incubadas na ausência de oxigênio (sistema GasPak, Becton Dickinson) para impedir eventual crescimento de bactérias aeróbias estritas. As placas restantes foram incubadas em aerobiose a 35°C, examinadas após 48h, mantidas à temperatura ambiente, e reexaminadas após outras 48h. As secreções faríngeas foram inoculadas nos mesmos meios de cultivo, obedecendo-se à ordem acima descrita.

Identificação das culturas bacterianas

As colônias bacterianas crescidas nos meios ASC, ACH e EMB foram identificadas usando-se metodologia convencional, como descrito previamente⁽¹³⁾. As que apareceram no BCSA e que, ao serem transferidas para o meio tríplice açúcar ferro, cresceram apenas na parte inclinada do meio, isto é, mostraram-se não-fermentadoras da glicose, foram identificadas usando-se uma bateria simples de testes bioquímicos tradicionais⁽⁹⁾. As culturas que apresentaram fenótipo compatível com "*B. cepacia*" foram enviadas ao Professor Anthony Hart, da Faculdade de Medicina de Liverpool, para confirmação diagnóstica através da análise

molecular do gene *recA*, como anteriormente publicado⁽³⁾. As culturas de *S. aureus* foram testadas para resistência a oxacilina e vancomicina pelo método rotineiro da difusão em ágar, segundo as normas da NCCLS⁽¹⁴⁾, e as culturas de *H. influenzae*, avaliadas para produção de β -lactamase pelo teste da cefalosporina cromogênica, usando-se discos de nitrocefina (Becton Dickinson).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do IMIP.

Resultados

As espécies bacterianas mais freqüentemente isoladas foram: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* e "*B. cepacia*". Alguns dados referentes a esses organismos, à fonte dos espécimes examinados e ao grupo etário dos pacientes estão condensados nas Tabelas 1 e 2.

P. aeruginosa, a bactéria mais freqüentemente encontrada, foi obtida de 96 espécimes (65,3%). Entre

esses isolados, 57 (59,3%) foram da variedade mucóide. Em 12 espécimes ambos os fenótipos, mucóide e não-mucóide, estiveram presentes. A seguir, em ordem decrescente de freqüência, vieram: *S. aureus* (29,9%), "*B. cepacia*" (29,2%) e *H. influenzae* (20,4%). Das 44 linhagens de *S. aureus* isoladas, apenas três (6,8%) foram resistentes à oxacilina, e nenhuma, à vancomicina. Entre os isolados de *H. influenzae*, 6,7% foram produtores de β -lactamase. O esquema de identificação fenotípica utilizado⁽⁹⁾ permitiu incluir determinada cultura no complexo "*B. cepacia*". Porém não foi capaz de distinguir as várias espécies dentro do complexo (resultados não-apresentados).

Microorganismos detectados em menor freqüência foram: *Achromobacter xylosoxidans* (sete; 4,8%), *Streptococcus pneumoniae* (cinco; 3,4%), *Stenotrophomonas maltophilia* (quatro; 2,7%), *Proteus mirabilis* (quatro; 2,7%), *Cryseobacterium meningosepticum* (três; 2%), *Acinetobacter baumannii* (três; 2,3%), *Klebsiella pneumoniae* (três; 2%), *Streptococcus pyogenes* (três; 2%), *Enterococcus faecalis* (um; 0,7%) e *Sphingobacterium multivorans* (um; 0,7%).

Tabela 1

Freqüência de isolamento de patógenos respiratórios de 36 fibrocísticos, em relação ao grupo etário

Grupo etário	Número de pacientes		<i>S. aureus</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. aeruginosa</i> mucóide		<i>B. cepacia</i>	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
0-5 anos	12	(33,3)	5	(41,7)	5	(41,7)	9	(75)	5	(41,7)	5	(41,7)
6-12 anos	11	(30,6)	6	(54,5)	8	(72,7)	3	(27,3)	2	(18,2)	4	(36,4)
> 12 anos	13	(36,1)	5	(38,5)	5	(38,5)	6	(46,1)	9	(69,2)	5	(38,5)
Total	36	(100)	16	(44,4)	18	(50)	18	(50)	16	(44,4)	14	(38,9)

De três pacientes não foram isoladas bactérias patogênicas.

Tabela 2

Espécies bacterianas patogênicas mais freqüentes em 147 espécimes respiratórios obtidos de 36 fibrocísticos

Espécime	Número de exames		Nenhum patógeno		<i>S. aureus</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cepacia</i>	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Escarro	114	(77,6)	4	(3,5)	38	(33,3)	29	(25,4)	77	(67,5)	31	(27,2)
Faríngeo	33	(22,4)	8	(24,2)	6	(18,2)	1	(3)	19	(57,6)	12	(36,4)
Total	147	(100)	12	(8,2)	44	(29,9)	30	(20,4)	96	(65,3)	43	(29,2)

Cinquenta e sete linhagens foram do fenótipo mucóide.

Discussão

Nossos resultados mostraram que as espécies bacterianas e respectivas prevalências, encontradas nos espécimes obtidos de fibrocísticos do Recife, durante consultas de rotina ou na exacerbação de infecções respiratórias, estão de acordo com os dados obtidos em outras populações^(4, 7, 22). O *S. aureus*, entretanto, foi isolado em frequência mais baixa que a observada nos registros da Fundação Norte-Americana de Fibrose Cística (FC)⁽²²⁾: 29,9% versus 37,5%, porém, ainda assim, ligeiramente superior à encontrada em inquérito realizado na Bahia: 28,9%⁽¹⁸⁾. A menor prevalência do *S. aureus* no Recife provavelmente decorreu da não-utilização de um meio de cultura seletivo. Recentes instruções da Fundação Norte Americana de Fibrose Cística recomendam a necessidade de se usar o meio ágar sal manitol na rotina bacteriológica de espécimes de fibrocísticos⁽¹⁷⁾.

Embora a cultura de espécimes faríngeos seja recomendada como uma alternativa à cultura para os fibrocísticos incapazes de fornecer escarro⁽¹⁷⁾, alguns estudos comparativos mostram que os espécimes faríngeos são inferiores ao escarro ou lavado bronco-alveolar no diagnóstico bacteriológico de infecções pulmonares naqueles pacientes^(1, 16). No presente trabalho, a avaliação da acurácia das culturas de faringe não foi possível já que não se submeteu o mesmo participante, após a coleta do *swab* faríngeo, a controle pela realização de lavado bronco-alveolar.

Dado preocupante observado nesta investigação, confirmando o que se encontrou na Bahia⁽¹⁸⁾, foi a elevada prevalência da *P. aeruginosa* entre crianças menores de seis anos, sinal que indica prognóstico mais reservado⁽¹⁵⁾; ademais, como visto, a *P. aeruginosa* foi o organismo mais comumente isolado das vias respiratórias de nossos fibrocísticos.

No que concerne à "*B. cepacia*", a prevalência encontrada neste estudo (29,2%) é maior que a observada em São Paulo, 11 (4,2%) isolados em 257 espécimes cultivados em meio seletivo⁽²⁰⁾. Surpreendentemente, no estudo realizado na Bahia, não há menção ao isolamento de *Burkholderia*⁽¹⁸⁾.

O elevado percentual de positividade para "*B. cepacia*" independeu de o espécime cultivado ser escarro ou *swab* faríngeo. A esse respeito, a faringe parece ser excelente *habitat* para bactérias do complexo "*B. cepacia*", permitindo sua colonização por longos períodos. Um dos nossos participantes, por exemplo, com dois anos de idade, forneceu em sua primeira cultura de orofaringe duas diferentes variantes genômicas do complexo, *B. cenocepacia* (variedade genômica III) e *B. vietnamiensis*⁽¹²⁾. No presente estudo, somente este paciente contribuiu com seis culturas positivas para *B. cenocepacia*; a linhagem de *B. vietnamiensis* não persistiu nas culturas subseqüentes. Um outro participante, menor de um ano, teve três culturas positivas. Portanto, das 12 linhagens de "*B. cepacia*" isoladas de *swabs* faríngeos nove (75%) foram fornecidas por apenas dois pacientes. Provavelmente, o grande número de espécimes cultivados e o pequeno número de pacientes incluídos no estudo, associados à longa persistência da "*B. cepacia*", podem ter contribuído para a elevada prevalência do organismo.

De interesse aos laboratórios clínicos, que não dispõem de metodologia molecular para a identificação de isolados pertencentes ao complexo "*B. cepacia*", foi a constatação do bom desempenho do esquema de identificação fenotípica empregado⁽⁹⁾. Esse esquema foi capaz de incluir no ou de excluir do complexo bactérias gram-negativas não-fermentadoras, porém sem determinar a espécie.

Na FC a interpretação clínica de uma cultura bacteriológica de espécimes respiratórios é problemática. Mesmo o isolamento repetido de determinada espécie bacteriana nos episódios de exacerbação de infecções respiratórias não implica responsabilidade etiológica. Assim, por exemplo, na maioria dos espécimes agora examinados foi comum o isolamento simultâneo de duas ou três espécies bacterianas consideradas potencialmente patogênicas. A persistente colonização da árvore respiratória torna praticamente impossível relacionar isolamento bacteriano à doença⁽⁴⁾. Além disso, a tendência à prolongada persistência de certas espécies bacterianas complica ainda mais o problema.

Referências

1. ARMSTRONG, D. S. et al. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, v. 21, p. 267-75, 1996.
2. COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*, v. 8, p. 692-6, 2002.
3. DETSIKA, M. G. et al. Molecular typing of, and distribution of genetic markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 4148-53, 2003.
4. DOERN, G. V.; BROGDEN-TORRES, B. Optimum use of selective plated media in primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 2740-2, 1992.

5. DÖRING, G. et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*, v. 16, p. 749-67, 2000.
6. GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics*, v. 23, p. 545-9, 1959.
7. GOVAN, J. R. W.; NELSON, J. W. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J R Soc Med*, v. 86, suppl. 20, p. 11-8, 1993.
8. HENRY, D. et al. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 1004-7, 1999.
9. HENRY, D. et al. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 1073-8, 2001.
10. HOGARDT, M. et al. Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 818-25, 2000.
11. KRZEWWINSKY, J. W. et al. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 3597-602, 2001.
12. MAGALHÃES, M.; de BRITTO, M. C. A.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III and *Burkholderia vietnamiensis* double infection in a cystic fibrosis child. *J Cystic Fibrosis*, v. 1, p. 292-4, 2002.
13. MURRAY, P. R. et al. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, DC: ASM Press, 1999.
14. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7th ed. Approved Standard M2-A7. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000.
15. NIXON, G. M. et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*, v. 138, p. 699-704, 2001.
16. ROSENFELD, M. et al. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pneumonol*, v. 28, p. 321-8, 1999.
17. SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control*, v. 31, S5-S40, 2003.
18. SANTANA, M. A. et al. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 7, p. 69-72, 2003.
19. SHREVE, R. M. et al. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 753-7, 1999.
20. SILVA FILHO, L. V. F. et al. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v. 44, p. 203-8, 2002.
21. TSUI, L. et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetic linked polymorphic DNA marker. *Science*, v. 230, p. 1054-7, 1985.
22. WHITTIER, S. Update on the microbiology of cystic fibrosis: traditional and emerging pathogens. *Clin Microbiol Newsl*, v. 23, p. 67-71, 2001.
23. ZACH, M. S. Lung disease in cystic fibrosis: an updated concept. *Pediatr Pneumonol*, v. 8, p. 188-202, 1990.

Endereço para correspondência

Marcelo Magalhães
 Laboratório Marcelo Magalhães
 Rua Sete de Setembro 508
 CEP 50050 - Recife-PE
 e-mail: marcelo@labmm.com.br