

LILIAM MACHADO AMALFI

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE
PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

LILIAM MACHADO AMALFI

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE
PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Saúde
da Criança e do Adolescente, área de concentração em
Saúde da Criança e do Adolescente

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Am 13p Amalfi, Liliam Machado
Perfil microbiológico de pacientes com fibrose cística / Liliam
Machado Amalfi. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Antonio Fernando Ribeiro
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Infecções respiratórias. 3. Escarro.
4. Infecções bacterianas. 5. Agentes antibacterianos.
I. Ribeiro, Antonio Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Microbiological profile of cystic fibrosis patients

Keywords: • Cystic fibrosis
• Respiratory infections
• Sputum
• Bacterial infections
• Antibacterial agents

Titulação: Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora: Prof Dr Antonio Fernando Ribeiro

Prof Dr Carlos Emilio Levy

Prof Dr Léo Roberto Barth

Data da defesa: 28-02-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

Membros:

1. Prof.(a). Dr(a). Antonio Fernando Ribeiro

2. Prof.(a). Dr(a). Carlos Emilio Levy

3. Prof.(a). Dr(a). Léo Roberto Barth

**Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 2007

Dedicatória

*A toda minha família,
base de tudo.
Em especial,
a meu pai,
José Oswaldo (in memoriam),
minha mãe,
Carlota,
meus irmãos e
meu marido,
Roberto, e
meus filhos
Priscila,
Matheus e
Rachel.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que, por toda minha vida, esteve presente. Por ter me presenteado com a dupla oportunidade maravilhosa e abençoada: a vida e a saúde para vivê-la com alegria.

A meu pai, José Oswaldo (*in memoriam*), que infelizmente não estava entre nós em nossas formaturas, mas nos mostrou o caminho do amor, da dignidade do trabalho e do estudo, para se atingir os objetivos.

À minha mãe, Carlota que, incondicionalmente nos amou. Meu sentimento de amor e admiração, e pelas ricas experiências de vida que me proporciona. Obrigada por tudo que nos ensinou, colaborando na formação da minha personalidade.

Aos meus queridos irmãos José Carlos e Daniel que, me ajudaram a realizar o sonho do título universitário, e que, atualmente com suas famílias, estão sempre presentes em nossas vidas, sempre com palavras de apoio e carinho.

A todos os meus tios maternos e paternos, que nos deram carinho, ajuda e atenção em momentos preciosos da vida.

Aos padrinhos e tios, Haroldo e Gilka, acolhendo e ajudando na adolescência; Egon (*in memoriam*) e Ormezinda pelo incentivo constante, pelo dom em reunir toda a família, de serem solidários ao próximo. Tia Ormezinda sinônimo de alegria, exemplo de determinação ao realizar o sonho de voltar a estudar aos 40 anos, graduando-se em três faculdades.

A meu marido Roberto que, sempre me incentivou ao estudo para alcançar a independência financeira, me ajudando a concluir este mestrado. Aos meus filhos amados, Priscila, Matheus e Rachel, pela compreensão na ausência e apoio em todas as decisões.

Dr. Matheus Amalfi Netto, um exemplo de profissional da saúde, que sempre soube discernir caráter e índole, apoiando-me tanto como nora como profissional.

Aos Professores doutores, Dr. Pedro Rosalen e Dra. Elvira. Ele professor de farmacologia na graduação, motivando aos interessados a busca por um diferencial profissional. Ela professora de pós-graduação, *Latu sensu* em Análises Clínicas, pelo entusiasmo contagiante e o prazer de ensinar. A ambos meu agradecimento pelo convite de mestrado na FOP/Unicamp e USP consecutivamente, que infelizmente na época não pude aceitar, por ter filhos pequenos. Exemplos de pessoas e bom caráter profissional.

Ao professor Dr. Leopoldo de Oliveira, psicólogo, professor de MBA FGV EAESP, engenheiro de cultura de empresas familiares, obrigada pelo carinho em nos atender em consultoria, conselhos e amizade prestados em nossa vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro, autoridade em assistência e tratamento da fibrose cística, coordenador do ambulatório no HC/Unicamp; pela confiança e orientação, que proporcionou a oportunidade de me aprofundar e interessar pelo tema, e de entendê-la através de seu ponto de vista amplo e brilhante. Foi um privilégio poder contar com sua orientação acadêmica, permeada pela dedicação, competência e objetividade exemplares.

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, chefe do Departamento de Pediatria, pelo convite para a Pós-Graduação, na época como coordenador da Saúde da Criança e do Adolescente. Cientista brilhante, sempre disposto a dividir com seus alunos o aprendizado.

Aos professores membros da banca de qualificação e titulação, Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo, Dr. Leo Bath, e Dr. Carlos Emílio Levy; pelo cuidado, pelo interesse e pela disposição em avaliar este trabalho, engrandecendo-o através de suas observações, críticas e sugestões.

Aos demais professores doutores do Curso de Pós-Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente; a Simone e Tathiane, que acompanha e com otimismo encoraja os alunos para as novas etapas que surgem.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia do HC/Unicamp, um laboratório que prima pela excelência e responsabilidade como prestador de serviço público. Aos profissionais Prof. Dr. Levy, Marizete, Priscila e Kateli, pela boa vontade ao doar as informações importantes não só para esta dissertação, mas pelo incentivo às futuras pesquisas.

Ao Helymar, do setor de Estatística FCM que, além de responder prontamente às questões do orientador, aceitou o desafio de aumentar o poder de comparabilidade dos resultados, diante de estudos nacionais e internacionais, ensinando as noções para realizarmos as estatísticas pertinentes às demais bases dados.

Ao pessoal da Informática HC/Unicamp, como Márcia e Patrícia, resgatando do Sistema Hospitalar, dados pertinentes para a pesquisa.

À Célia e voluntárias da Fibrocis e do ambulatório, que lutam para melhorar a qualidade de vida e dignidade de todos os pacientes, sempre dispostos ao incentivo às pesquisas fornecendo-nos informações importantes.

Aos pacientes de fibrose cística e seus familiares que, colaboram e nos permitem coletar informações.

À CAPES, que através do departamento da Saúde da Criança e do Adolescente, me proporcionou no último ano, uma bolsa de estudos, importante na conclusão do mestrado.

E por último, aos pais de Manoela (*in memoriam*) e Jessica, pelo exemplo de vida, amor incondicional, dedicação, coragem e esperança ao enfrentar a realidade de ter as suas duas únicas filhas, acometidas pela fibrose cística.

*“... E vós também
pondo nisto mesmo toda a diligência,
acrescentai à vossa fé a virtude,
e à virtude a ciência.
E à ciência temperança,
e temperança paciência,
e à paciência piedade.
E à piedade amor fraternal;
e ao amor fraternal caridade.”*

EVANGELHO IIº PEDRO 1:5-7

	Pág.
RESUMO	<i>xliii</i>
ABSTRACT	<i>xlvii</i>
1- INTRODUÇÃO	51
1.1- Fibrose cística	53
1.2- Fisiopatogênese da fibrose cística	56
1.2.1- Regulador da condutância transmembrana da fibrose cística – CFTR.....	59
1.2.2- Função da proteína CFTR na fibrose cística.....	61
1.2.3- Papel da proteína CFTR na doença pulmonar.....	62
1.2.4- Mutações no polipeptídeo CFTR - genética da fibrose cística.....	67
1.3- Critérios Diagnósticos	69
1.3.1- Critérios clínicos.....	69
1.3.2- Critérios laboratoriais.....	71
1.3.2.1- Triagem neonatal (teste do pezinho).....	71
1.3.2.2- Teste do suor.....	72
1.3.2.3- Estudo genético.....	73
1.3.2.4- Outros critérios laboratoriais.....	74
1.3.2.4.1-Elastase fecal.....	75
1.4- Microbiologia da fibrose cística	76
1.4.1- <i>Staphylococcus aureus</i>	78
1.4.1.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	79
1.4.1.2- Patogenia e imunidade.....	81
1.4.1.3- Transmissão e vias de aquisição.....	82

1.4.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
1.4.2.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	85
1.4.2.2- Patogenia e imunidade.....	87
1.4.2.3- Transmissão e vias de aquisição.....	89
1.4.3- Morfotipo mucóide.....	90
1.4.3.1- Patogenia e imunidade.....	91
1.4.3.2- Transmissão e vias de aquisição.....	93
1.4.4- Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	93
1.4.4.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	96
1.4.4.2- Patogenia e imunidade.....	97
1.4.4.3- Transmissão e vias de aquisição.....	97
1.4.5- <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	98
1.4.5.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	99
1.4.5.2- Transmissão e vias de aquisição.....	99
1.4.6- <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>parainfluenzae</i>	99
1.4.6.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	100
1.4.6.2- Transmissão e vias de aquisição.....	101
1.4.7- <i>Klebsiela pneumoniae</i>	101
1.4.8- Fungos.....	102
1.4.8.1- Epidemiologia e impacto clínico.....	103
1.4.8.2- Transmissão e vias de aquisição.....	103
1.4.9- Micobactérias e vírus.....	103

1.5- Tratamento.....	104
1.5.1- Antibioticoterapia.....	105
1.6- Estudos de susceptibilidade antimicrobiana.....	109
1.7- A informática nas pesquisas científicas.....	109
1.7.1- Registro Eletrônico do Paciente (REP).....	110
1.7.1.1- Sigilo ético de pesquisa com arquivos eletrônicos.....	110
2- OBJETIVOS.....	113
3- CASUÍSTICA E MÉTODO.....	117
3.1- REP - Critérios de inclusão.....	119
3.1.1- Variáveis.....	120
3.1.2- Vantagens e limites encontrados no resgate das variáveis do REP.....	123
3.2- Arquivos do Laboratório de Microbiologia (ALM).....	125
3.3- Análise de prontuários de pacientes (PP).....	126
3.4- Metodologia estatística.....	127
3.4.1- REP.....	127
3.4.2- ALM.....	128
3.4.3- PP.....	128
3.5- Amostra laboratorial.....	128
3.5.1- Cultura de Rotina Diagnóstica (CRD).....	129
3.5.1.1- Pesquisa de Germes multirresistentes.....	129
3.5.1.2- Coleta.....	130
3.5.1.3- Transporte.....	130
3.5.1.4- Periodicidade das coletas.....	131
3.5.1.5- Armazenamento das bactérias isoladas.....	131

3.6- Coloração de Gram e microscopia.....	131
3.7- Culturas.....	132
3.7.1- Pesquisa de fungos.....	133
3.8- Caracterização fenotípica por microrganismos.....	133
3.9- Automação microbiológica.....	133
3.10- Procedimentos para identificação.....	134
3.10.1- Identificação de bacilos não fermentadores.....	134
3.10.2- Identificação <i>Staphylococcus aureus</i>	138
3.10.2.1- Prova da catalase.....	139
3.10.2.2- Teste da coagulase em lâmina.....	139
3.10.2.3- Teste da coagulase em tubo.....	140
3.10.2.4- Outros testes.....	140
3.11- Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	140
3.11.1- Pelo método da difusão de disco.....	141
3.11.2- Pelo método de fita de E-teste.....	142
4- RESULTADOS.....	143
4.1- Dados obtidos do Registro Eletrônico do Paciente (REP).....	145
4.2- Dados obtidos dos Arquivos do Laboratório de Microbiologia (ALM).....	150
4.3- Dados obtidos dos Resultados de CRD referentes aos Prontuários de Paciente (PP).....	152
4.4- Perfil de susceptibilidade antimicrobiana (ALM e PP).....	154
4.5- Resultados das três bases dados (REP, ALM e PP).....	164
5- DISCUSSÃO.....	167
6- CONCLUSÃO.....	175

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
8- ANEXOS.....	195
Anexo 1- Aprovação CEP/FCM/Unicamp - Dispensa TCLE.....	197
Anexo 2- Relatório Estatística FCM/Unicamp.....	199
9- APÊNDICES.....	207
Apêndice 1- Códigos para coleta dados ALM e PP.....	209
Apêndice 2- Planilha para coleta dados ALM e PP.....	211

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
AC	Ágar-chocolate
ADP	Adenosina Bi fosfato
ALM	Arquivos do Laboratório de Microbiologia/HC Unicamp
ALI/ARDS	Acute lung injury / acute respiratory distress syndrome
AS	Ágar-sangue
ASL	Líquido da superfície vias aéreas
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Tri fosfato
BCSA	Burkholderia cepacia Selective Agar
BHI	Brain Heart Infusion
CFTR/CFTR	Proteína/Gene Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CCIH	Comissão de Infecção Hospitalar
CRD	Cultura de rotina diagnóstica
eNAC	Canal de sódio
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
FC	Fibrose cística
GMP	Monofosfato guanosina cíclica
Mbla	Metallo- β -lactamase
MC	Ágar de MacConkey
MCT	Transporte mucociliar
MEP	Mucoid exopolysaccharide

MRSA	Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus
MS	Ágar de sal manitol
MSSA	Methicilin-Susceptible Staphylococcus aureus / Oxa-sensíveis
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NE	Elastase neutrófilo
ORCC	“Outwardly Rectifying Chloride Channel”
PB	Polimixina B
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PMN	Polimorfo nucleares
PP	Prontuário do paciente
RE	Retículo Endoplasmático
REP/PEP	Registro Eletrônico do Paciente/Prontuário Eletrônico do Paciente
SI/SH/NIHC	Setor Informática/ Sistema Hospitalar/ Núcleo de informática HC/ Unicamp
TIR/IRT	Tripsina Imunorreativa/Imuno Tripsina Reativa

LISTA DE ABREVIATURAS QUÍMICAS

Ca²⁺	Íon cálcio
Cl⁻	Íon cloreto
K⁺	Íon potássio
H⁺	Hidrogênio
HCO₃⁻	Bicarbonato
H₂O	Água
Na⁺	Sódio

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Análise descritivas das variáveis CRD's resgatadas do REP por ano.....	145
Tabela 2 Calculo das variáveis das CRD's por paciente ano.....	145
Tabela 3 Análise descritiva da quantidade de exames CRD's realizados por paciente (n=100) resgatados do REP.....	146
Tabela 4 Análise descritiva de CRD's sobre a faixa etária dos pacientes (REP).....	147
Tabela 5 Cálculos das variáveis em relação à faixa etária dos pacientes (REP).....	147
Tabela 6 Análise descritiva dos microrganismos isolados, sobre o total de CRD's registrados no REP (n=975).....	148
Tabela 7 Análise descritiva das CRD's resgatadas dos Arquivos do Laboratório de Microbiologia por paciente/ano (n=402).....	151
Tabela 8 Distribuição das variáveis em relação à faixa etária dos pacientes, registrados nos ALM (n=96).....	151
Tabela 9 Análise descritiva dos principais microrganismos isolados e cadastrados nos arquivos do laboratório de microbiologia (ALM), calculado sobre o total de CRD's (n=402).....	152
Tabela 10 Análise descritiva dos principais microrganismos resgatados dos ALM, calculado sobre o total de pacientes (n=100).....	152
Tabela 11 Análise descritiva das CRD's resgatadas dos prontuários dos pacientes (PP) com mais de 10 anos de acompanhamento ambulatorial, pelo numero de CRD's (n=370).....	153

Tabela 12	Análise descritivas das variáveis em relação a faixa etária dos pacientes relativos à CRD's resgatados dos PP's de pacientes com FC (n=9) (PP).....	153
Tabela 13	Análise descritiva dos microrganismos isolados, sobre o numero de exames realizados (n=370), registrados em laudos arquivados nos prontuários dos pacientes com FC (n=9).....	154
Tabela 14	Análise descritiva dos microrganismos resgatados das três bases de dados analisadas, sobre o numero de CRD's (1ª coluna), como por paciente (2ª coluna) (REP, ALM e PP).....	154
Tabela 15	Análise descritiva dos diferentes microrganismos resgatados das três bases de dados analisadas, sobre o número de CRD (1ªs colunas, como por paciente (2ªs colunas) (REP, ALM e PP).....	164

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Biofísica Epitelial da CFTR na FC: proteína transmembrana CFTR na fibrose cística.....	58
Figura 2 Topologia da proteína CFTR.....	60
Figura 3 Diagrama hipotético da fisiopatogenia da fibrose cística.....	66
Figura 4 Esquematização hipotética da FC na doença pulmonar.....	68
Figura 5 Manifestações clínicas na fibrose cística.....	71
Figura 6 Fatores de virulência <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Figura 7 Fatores de virulência <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
Figura 8 Evolução da frequência dos microrganismos durante o período do estudo REP.....	149
Figura 9 Evolução da frequência dos microrganismos de acordo com a faixa etária REP.....	150
Figura 10 Perfil microbiológico de pacientes com FC nas três bases de dados.....	165
Figura 11 Gráfico ‘bidimensional Error Bar Plot’ - interactive Graph, para análise das médias das frequências dos microrganismos, utilizando a média do intervalo de confiança IC 95 % no REP, ALM e PP.....	166

	Pág.
Quadro 1 Variantes genômicas do complexo <i>B. cepacia</i> e distribuição de espécies entre os isolados, encontrados em pessoas com FC nos EUA, Canadá e Itália.....	95
Quadro 2 Tela interativa do software Access selecionando ferramenta filtro, as variáveis deste estudo.....	120
Quadro 3 Ferramenta de consulta do Access, utilizando a ‘ferramenta filtro’ para selecionar as variáveis escolhidas (total de exames CRD’s por paciente), utilizando data de coleta.....	121
Quadro 4 Exemplo de ferramenta consulta filtro para contar a quantidade ‘total CRD por paciente’	122
Quadro 5 Tela interativa com o resultado da pesquisa acima da distribuição da quantidade de CRD’s realizados por paciente ao longo do período estudo (REP).....	123
Quadro 6 Amostras que requerem tratamento prévio antes da coloração de Gram.....	132
Quadro 7 Principais BNFs e testes aplicados.....	134
Quadro 8 Provas, semeaduras, leitura e interpretação dos BNFs.....	135
Quadro 9 Procedimentos para a identificação Gram-negativos.....	137
Quadro 10 Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos.....	137
Quadro 11 Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos.....	138
Quadro 12 Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos.....	138

Quadro 13	Provas diferenciais <i>S. aureus</i> dos gêneros Catalase positivo.....	139
Quadro 14	Provas diferenciais <i>S. aureus</i> de maior importância clínica.....	139
Quadro 15	Antimicrobianos selecionados neste estudo e suas respectivas concentrações.....	141
Quadro 16	Perfil susceptibilidade <i>P. aeruginosa</i> versus Aminoglicosídeos.....	156
Quadro 17	Perfil susceptibilidade <i>P. aeruginosa</i> mucóide versus Aminoglicosídeos.....	157
Quadro 18	Perfil susceptibilidade <i>P. aeruginosa</i> <i>P. aeruginosa</i> mucóide versus Cefalosporina.....	158
Quadro 19	Perfil susceptibilidade <i>P. aeruginosa</i> <i>P. aeruginosa</i> mucóide versus Fluoroquinolona.....	159
Quadro 20	Perfil susceptibilidade <i>P. aeruginosa</i> <i>P. aeruginosa</i> mucóide versus Carbapenêmicos.....	160
Quadro 21	Perfil susceptibilidade <i>Staphylococcus aureus</i> versus Penicilinas.....	161
Quadro 22	Estudo de Susceptibilidade Antimicrobiana aos 2 morfotipos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide quando isoladas concomitante no mesmo CRD, versus Cefalosporinas 3a. geração (Ceftazidima), Carbapenêmicos (Imipenem), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina).....	162
Quadro 23	Estudo de Susceptibilidade Antimicrobiana aos 2 morfotipos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide quando isoladas concomitante no mesmo CRD, versus Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina).....	163

RESUMO

Considerando que a fibrose cística é a mais importante doença hereditária, potencialmente letal, incidente na raça branca, que a infecção pulmonar é reconhecida por ter o maior papel na morbimortalidade levando à morte prematura em 90% dos pacientes, e que a principal causa das exacerbações é as infecções recorrentes ou crônicas; torna-se fundamental para um centro de referência, o conhecimento do perfil microbiológico de seus pacientes. A correlação entre a exacerbação dos sintomas pulmonares e a contagem de colônias de bactérias na cultura rotina diagnóstica (CRD) serve para orientar o controle das infecções. Norteados por este fundamento, para o perfil microbiológico utilizaram-se resultados CRD do: Registro eletrônico do Paciente (REP), Arquivo do Laboratório de Microbiologia (ALM) e Prontuário do paciente (PP). As três bases dados pertencem à mesma casuística, sendo que os dois últimos foram utilizados para verificar a coerência entre os perfis e estudo da susceptibilidade. Estatística: χ^2 , Fisher, *Pearson*, regressão linear, e, nível significância $p < 0.05$ e IC 95%. Foram resgatados 38.480 registros do REP, referentes a 975 CRD's, 402 nos ALM's e 371 dos PP's. Foram isoladas: *Pseudomonas aeruginosa* em 80,9% REP (43% pertenciam ao morfotipo não mucóide), nos ALM em 70,8% (43% não mucóide) e em 100% dos PP (60,6% não mucóide) e; *Staphylococcus aureus* em (50,1% REP, 48% ALM, e em 55% PP). Microrganismos emergentes como *Burkholderia cepacia* em (3,69% REP, 1% ALM, e em 3,5% dos PP's), *Strenotrophomonas maltophilia* em (3% REP, 2,8% ALM e 1,6% PP). Observamos uma elevada prevalência dos *P. aeruginosa*, durante o 1º ano de vida (57%), diferença significativa se comparadas aos resultados da *Cystic Fibrosis Foundation* e Consenso Europeu que relatam uma prevalência de 20% entre 0-5 anos. Em relação à prevalência da *B. cepacia*, foi utilizado o meio seletivo, elevando a prevalência para 13% no ano de 2003, e, se observados ao longo dos anos, o valor se assemelha aos demais estudos (3,6%). Em relação ao estudo de susceptibilidade antimicrobiana, foram encontradas 13 cepas de *P. aeruginosa* multidroga-resistente aos 5 antibióticos incluídos no estudo (3,23% CRD's em 3 pacientes). Das *P. aeruginosa* 13,4% foram sensíveis a todos os antimicrobianos (ALM). Foi possível observar resistência das cepas *P. aeruginosa* aos antibióticos frequentemente utilizados como a Gentamicina (50%) e Amicacina (31%). As mesmas cepas foram sensíveis à Ceftazidima (45%), Ciprofloxacina (48,7%). Foram isoladas em 389 dos 402 CRD's (ALM), ambos morfotipos (mucóide e não mucóide) apresentando elevada sensibilidade a

Ceftazidima, Imipenem e Amicacina (66,9, 56,3% e 60% respectivamente) e, dentre eles, o que apresentou maior eficácia e menor resistência foi a Ceftazidima (5,4%). As cepas de *S. aureus* apresentaram elevada sensibilidade (72,7% ALM e 100% PP) sendo que dos 183 antibiogramas somente 11 cepas (6% em 5 pacientes ALM) apresentaram-se Oxa-Resistente, apesar de uma prevalência elevada e persistente. O perfil microbiológico, utilizando REP, foi coerente com ALM e PP, sugerindo que dados eletrônicos podem se amoldar às perspectivas de futuras pesquisas, levando-se em consideração a necessidade de novos estudos e maior interação entre as equipes, ajustadas as correções de possíveis vieses.

ABSTRACT

Considering that the Cystic Fibrosis is the most important hereditary illness potentially lethal incident in Caucasoid, and the pulmonary infections has been recognized as having the greatest role in the morbid mortality, being cause of death in 90% of the patients, and the main exacerbations cause are the recurrent or chronic infection/ the knowledge in the microbiological profile from patients becomes basic for all reference centers. When infected, the treatment will depends of microorganisms characteristics (antimicrobial resistance and ambient conditions) and, the prognostic depends of the nutritional and immunological conditions; The correlation between the exacerbation from pulmonary symptoms and the counting of bacteria colonies by the culture routine diagnosis (CRD), serves to guide and control the infections. Guided by this bedding, our objective was to delineate this profile, using the CRD results from: Electronic Patient Register (REP), Archives from Microbiology Laboratory (ALM) and Handbooks of Patient (PP). All the databases belong to the same casuistry, being ALM data and PP collected to verify if the electronic registers correspond to the findings and notations in these archives. For the statistical calculations: descriptive analysis, χ^2 , fisher, correlation Pearson and linear regression and the significance were $p < 0,05$ and IC 95%. Were analyzed 975 CRD's results between 38.480 registers from REP (100 patients), 402 from ALM (100 patients) and 371(9 patients) from PP's. Were identified: *Pseudomonas aeruginosa* in 80,9% from REP (43.1% belonged to morphotype mucoid), from ALM in 70,8% (27.8% mucoid) and PP (51.4% mucoid); *Staphylococcus aureus* in (50.1% REP, 48% ALM, and in 55% PP). Emergent microorganisms as *Burkholderia cepacia* in (3.69% REP, 1% ALM, and in 3,5% of the PP's), *Stenotrophomonas maltophilia* in (3% REP, 2.8% ALM and 1.6% PP). In relation of microorganisms prevalence, we observed a high significant prevalence of the *Pseudomonas aeruginosa* during the first year life (57%), greater than the results from Cystic Fibrosis Foundation and European Consensus (20% of 0-5 yrs). In relation of *Burkholderia cepacia* prevalence, the selective media was used (year 2003), increasing the prevalence to 13%, if observed during a long period, it would be equivalent to found (3,6%). About antimicrobial susceptibility, 13 of *P. aeruginosa* multi-drugs resistant were found to all usual antibiotics (3,3% CRD of 3 patients). The *P. aeruginosa*, 13,4% were sensitive to all antimicrobiana. We observed a great resistance between *P. aeruginosa* against to usual antibiotics as Gentamicine (50%) and Amicacine (31%). The same cepas

were sensitive to Ceftazidima (45%), Ciprofloxacin (48,7%). Of 389 CRD's (ALM), were simultaneously found the both morphotypes (mucoid and nonmucoid) that showed a high sensitive to Ceftazidima, Imipenem e Amicacin (66,9, 56,3% e 60%) and the more effective and less resistant was Ceftazidima (5,4%). The *Staphylococcus aureus* were high sensitive (72,7% ALM and 100% PP) and just 11 cepas in 183 (5,9%) were Oxa-Resistant in 5 patients, even thought the high and persistent prevalence. The microbiological profile of cystic fibrosis patient from REP corresponds to the results from ALM and PP, suggesting that the electronic register can be molder to the perspectives of future researches, with news studies on this subject, and to plan more interaction between teams to correct any possible vises to appropriate research.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Fibrose cística

Fibrose cística (FC), nome derivado do aspecto cístico e fibroso do pâncreas, é uma patologia hereditária, multissistêmica e crônica (Mims, 1995).

As primeiras referências de pacientes provavelmente com a doença da FC, apareceram na literatura, desde o século XVI, como relatos de autópsias (Ribeiro AF et al., 2005).

São seis décadas desde a primeira descrição da fibrose cística como uma doença fatal do pâncreas (Ashlock, 2006).

Desde 1960 tem se tornado a mais pública de todas as doenças genéticas humanas, e atualmente considerado o distúrbio autossômico recessivo fatal mais comum de crianças nas populações caucasianas (Nussbaum et al., 2001).

Dorothy Hansine Andersen¹ (1938) foi a primeira pesquisadora médica que reconheceu a fibrose cística e que dedicou parte de sua vida aos estudos avançados desta doença. Publicou um estudo pioneiro detalhado de 49 pacientes de FC, que foram categorizados em três grupos, baseados na idade da morte dos pacientes.

A autora descreveu crianças que tinham abdômen distendido e ataques de diarreia com fezes abundantes, pálidas e de odor fétido, por conta da baixa porcentagem de gorduras processadas. As observações feitas no estudo permitiram entender a FC como uma doença única, mas com diversos efeitos, e uma coleção de estados de doenças relacionadas (Gilligan, 1991).

A designação FC do pâncreas foi derivada da descoberta de crianças que morriam no período neonatal tinham lesões histopatológicas características no pâncreas. O trabalho de Dorothy Andersen descreveu dois problemas fisiopatológicos importantes encontrados na FC: a insuficiência pancreática relacionada à má nutrição, bem como infecções das vias aéreas. Ambas relacionadas às secreções viscosas (Gilligan, 1991).

¹Andersen DH, *apud* Damrosch, Douglas S., "Dorothy Hansine Andersen," *Journal of Pediatrics*, October 1964, pp. 477-479.

Um jovem médico italiano, Dr. Paul di Sant’Agnese², assistente da equipe de Andersen no Hospital infantil Presbiteriano, cuidou da primeira criança diagnosticada com FC.

Enquanto servia como chefe da pediatria clínica, descobriu a associação entre FC e depleção de sal, o que o levou a suspeitar do excessivo sal perdido através do suor-um conceito revolucionário não aceito por anos.

Em 1953, publicou os resultados confirmando o defeito do transporte de eletrólitos, de fundamental significância nesta anormalidade, postulando que a FC não era simplesmente uma doença que afeta o pâncreas e secundariamente o sistema respiratório como Andersen tinha proposto, mas como uma desordem generalizada do metabolismo (Farrel, 2005; Quinton, 2007).

O “teste do suor” rapidamente se tornou o diagnóstico padrão ouro, especialmente quando Gibson, aconselhado por di Sant’Agnese, desenvolveu o método iontoforese de pilocarpina (Quinton, 1983, 1990a, 1990b).

Reconhecida como uma doença hereditária, autossômica recessiva já na década de 1930, a FC tem sido considerada uma doença monogênica (Raskin, 1999).

Devido à sua frequência relativamente alta, a ausência quase absoluta de compreensão fisiológica subjacente, e nenhuma anomalia cromossômica estrutural; a escolha da técnica na área de biologia molecular foi da clonagem posicional para a descoberta do gene responsável pela FC (Nussbaum et al., 2002).

Embora marcadores mais próximos estivessem a certa distância do gene responsável pela doença, ficou claro que 90% dos cromossomos tinham um haplótipo particular (Nussbaum et al., 2002).

Segundo estes autores, este resultado é conhecido como desequilíbrio de ligação, que é definido como a associação preferencial de um gene de doença com marcadores próximos.

²Paul di Sant’Agnese *apud* Quinton PM. Disponível em URL: <http://www.physiologyonline.org> 2007.

Tsui et al. (1985) utilizando-se de técnicas de clonagem posicional e salto cromossômico isolou e mapeou o *locus* da FC.

As pesquisas para a determinação de sua base genética culminaram na identificação e clonagem do gene em 1989, após intensa série de investigações que ilustram a importância tanto do mapeamento físico quanto do mapeamento genético (Rommens, 1989; Riordan, 1989; Keren et al., 1989).

O gene da FC, localizado no braço longo do cromossomo 7, no *locus* q31, é formado por 250kb de ácido desoxirribonucléico (DNA), com 27 éxons e tem a propriedade de codificar um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de 6,5 Kb, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora de transporte iônico, composta de 1.480 aminoácidos (Tsui, 1995).

O gene codifica uma proteína envolvida no transporte de cloretos, cuja sigla inglesa é *CFTR* - "cystic fibrosis transmembrane regulator" (Tsui, 1995).

Na década de 90, a FC foi caracterizada pela disfunção de superfícies apicais mucosas como as glândulas exócrinas, e o epitélio que reveste a via respiratória, a via gastrintestinal, assim como ductos excretorios das glândulas sudoríparas, genital, pancreáticas e hepáticas (Johnson, 2000).

As mucosidades produzidas por essas glândulas são muito mais espessas do que o normal e dificultam a liberação das enzimas do pâncreas e a eliminação das secreções mucosas das vias aéreas (Morales e Fernandez, 1997).

As obstruções geradas causam deficiências no aparelho digestivo e nas vias respiratórias, favorecendo, de forma especial nos pulmões, o início da colonização por diversos microrganismos de difícil erradicação (Morales e Fernandez, 1997; Kroll e Terra, 1999).

Segundo Ribeiro JD et al. (2002) e Ribeiro AF et al. (2005), nos últimos 15 anos, novos estudos em biologia molecular, genética, transporte iônico (bioquímica e fisiologia) e do sistema imunológico, vêm sendo aprofundados para a melhor compreensão

dos mecanismos bioquímicos responsáveis pela patogênese da doença, abrindo horizontes para o aconselhamento genético e o tratamento de suas complicações.

Com uma incidência de 1:2.000 em norte europeus, 1:9.000, hispânicos, 1:17.000 em anglo-americanos, no Brasil, a FC tem sido encontrada em todas as regiões, com incidência variável, dependendo da origem da população predominante (Raskin, 2001; Brasil, 2003).

Em algumas regiões, encontram-se incidências altas como um (1) em cada 2.500 nascidos vivos, como descritos nos estudos no estado do Paraná, porém não há estudos epidemiológicos abrangentes que permitam estimar a incidência geral da doença no Brasil. A estimativa é de que menos de 10% do total anual de casos sejam diagnosticados (Raskin, 2001; Brasil, 2003; Lemos 2004).

A expectativa de vida para pacientes com FC tem aumentado desde a sua descrição. Muitos avanços em cuidados médicos, incluindo monitoramento mais próximo, e intervenção precoce para má nutrição e infecção respiratória. O “screening” neonatal (SN) propicia o monitoramento e tratamento mais precoce, possibilitando aumento na sobrevida do paciente (Waggner et al., 2003).

Segundo Álvarez et al. (2004) em um dos estudos realizados no HC/Unicamp, observou-se que a idade de início de sintomas variou desde o nascimento até 20 anos. A mediana de diagnóstico no EUA é de 2,9 anos, e no Brasil é de 4,2 anos, sendo que 60% dos pacientes apresentavam desnutrição já por ocasião da primeira consulta.

Neste contexto, apesar da FC apresentar uma morbimortalidade muito elevada, o prognóstico tem melhorado, chegando os índices de 75% de sobrevida até o final da adolescência e de 50% até a terceira década de vida. Estudos anteriores demonstravam que apenas 10% dos pacientes ultrapassavam 30 anos de idade no Brasil (Brasil, 2003).

1.2- Fisiopatogênese da fibrose cística

O defeito observado na FC é a mutação no gene que codifica a proteína reguladora da condutância iônica transmembrana CFTR (Toporovski, 1995).

Mutações presente nos dois alelos do cromossomo 7 no gene (*locus*) *CFTR*, resultam em anormalidades no transporte de íons cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-), reguladas pelo AMPc através das células epiteliais (Davis, 1987; Lodish et al., 2000; Nussbaum et al., 2002).

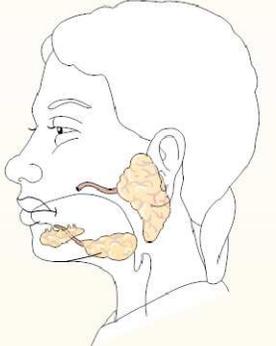
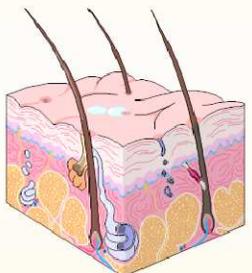
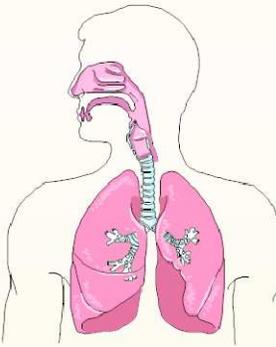
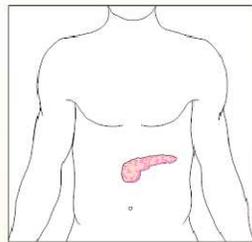
Na FC, as secreções destas glândulas e áreas afetadas, são muito espessas, considerado o elemento-chave na fisiopatogênese da FC (Morales e Fernandez, 1997).

No contexto biofísico, o transporte de cloretos através da *CFTR*, se faz na direção intracelular ou extracelular, dependendo da biofísica epitelial envolvida no transporte de íons transmembrana e o tipo de glândula afetada (Ribeiro AF, 2005).

Na FC, um defeito no gene *CFTR* nos ductos das glândulas sudoríparas leva a uma **diminuição da reabsorção** de cloreto de sódio do lúmen, resultando em concentrações aumentadas de cloro no suor; entretanto, no epitélio respiratório, um defeito no gene *CFTR* resulta em uma **redução ou perda de secreção de cloro para as vias aéreas**, reabsorção ativa de sódio (Na^+) e água (H_2O) e como consequência a desidratação do muco (Cassola, 2000; Kierszenbaum, 2004).

A implicação fisiológica do bicarbonato no pâncreas sobre a inibição do Cl^- extracelular no pâncreas através do bloqueio da *CFTR*. Observou-se **um aumento de íon bicarbonato luminares** consequente da diminuição da secreção (intracelular), juntamente com marcador ânion para o canal de cloretos, sugerem a inibição *CFTR* e **diminuição Cl^-** no lúmen pancreático (Figura 01) (Kierszenbaum, 2004).

BIOFÍSICA EPITELIAL: proteína transmembrana *CFTR* na fibrose cística

 <p>Glândulas salivares</p>	<p>CFTRNORMAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Canal CFTR excretam sódio (Na^+) na formação saliva; [] NaCl e H_2O = saliva normal. <p>DISEUNÇÃOΔCFTR</p> <ul style="list-style-type: none"> O misto de muco e componentes serosos da glândula salivar \uparrow[] Na^+ (*). o muco secretado da glândula labial contém \uparrow[] de marcadores de Na^+; \uparrow H_2O, \uparrow produção saliva; histologicamente: ácinos + material de eosinófilos (# células de defesa do sg. presentes em infecções). 	 <p>Glândulas sudoríparas</p>	<p>CFTRNORMAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Canal CFTR excretam sal (Na^+ e Cl^-) na formação suor; [] normal NaCl e H_2O = suor normal. <p>DISEUNÇÃOΔCFTR</p> <ul style="list-style-type: none"> \downarrow [] Cl^- reabsorvido na superfície epitelial; \uparrow [] Cl^- e Na^+ na pele; \uparrow H_2O na pele = \uparrow [] sal (NaCl) no suor, explica o teste do suor como padrão.
 <p>Pulmão</p>	<p>CFTRNORMAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Superfície das vias aéreas reabsorvem sal na forma (Na^+ e Cl^-) do ASL; atraindo [] normal de H_2O para dentro das células = mantendo o muco saudável vias aéreas. <p>DISEUNÇÃOΔCFTR</p> <ul style="list-style-type: none"> Nas vias aéreas o Na^+ e Cl^- são absorvidos anormalmente forçando uma \uparrow[] H_2O reabsorvida por osmose para o interior das células = muco seco e desidratado. 	 <p>Pâncreas</p>	<p>CFTRNORMAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Ácidos estomacais são neutralizados pelos ânions HCO_3^-; o HCO_3^- luminal age como um potente regulador CFTR. permite PH adequado para ação das enzimas pancreáticas; $\text{HCO}_3^- = \text{N}^+ [] \text{Cl}^-$. <p>DISEUNÇÃOΔCFTR</p> <ul style="list-style-type: none"> \downarrow [] secreção $\text{HCO}_3^- = \downarrow \text{CFTR} = \downarrow \text{Cl}^-$ \downarrow PH = \downarrow ação das enzimas (endógenas e exógenas); insuficiência pancreática. <p><i>Amalfi LM, 2007. Made with trial copy of SmartDraw healthcare v.2008.</i></p>

\uparrow aumento, \downarrow diminuição, [] concentração, # não unânime, Δ ou ausência da proteína CFTR. Íons: HCO_3^- (bicarbonato), Na^+ (cátion sódio), Cl^- (ânion cloreto) e H_2O (água).

Figura 1- Biofísica epitelial da CFTR presente nas membranas epiteliais dos principais órgãos acometidos pela FC [baseado nos relatos publicados por Davis, 1987; Gray et al., 2001; Rosenfeld et al., 2003]. No pâncreas o $\uparrow \text{HCO}_3^-$ luminal pela \downarrow secreção bicarbonato no epitélio do pâncreas \rightarrow potente regulador de CFTR + um marcador ânion externo para o canal de cloro \rightarrow sugere: inibição CFTR

1.2.1- Regulador da condutância transmembrana da fibrose cística - CFTR

Como já mencionado, a fisiologia da proteína transmembrana CFTR começou a ser decifrada em 1953 por Paul di Sant'Agnesse com a observação de que o suor dos pacientes, continha altos níveis de eletrólitos.

Estudos histológicos e bioquímicos revelaram que o gene que codifica a proteína CFTR, pertence à família de proteínas transportadoras ABC, assim chamada porque tem um domínio de ligação para o trifosfato de ATP (do inglês ATP-binding cassetes) e necessita hidrolisar moléculas de ATP para transportar íons, no caso da FC o íon Cl⁻ (Kierszenbaum, 2004; Nelson e Cox, 2006).

O transporte de íons de algumas moléculas biológicas como glicose, moléculas ionizadas e pequenos íons como H⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ são incapazes de dissolver no interior hidrofóbico da bicamada fosfolipídica (Nelson e Cox, 2006).

Elas necessitam da ajuda de proteínas transportadoras específicas e canais seguindo o potencial elétrico (p. ex., para cada três (3) íons de Na⁺ que se move para fora para cada dois (2) íons de K⁺ que se move para dentro da célula). Processo conhecido como eletrogênico, que consome 25% da energia total consumida no metabolismo de uma pessoa em repouso (Johnson, 2000; Kierszenbaum, 2004).

O fluxo de íons pelos canais pode ser passivo movido pela concentração, pelo movimento térmico e pela diferença de potencial elétrico na membrana celular (Cassola, 2000).

Assim, segundo o autor, o fluxo restante de íons pelos canais, que lhe são seletivos, dependerá da diferença de concentração entre os compartimentos intra e extracelulares e da diferença de potencial elétrico na membrana celular, ligação de compostos à proteína do canal, fosforilação e ligação à proteína de íons outros que não passam pelo canal, mas tem afinidade por sítios da proteína podem modificar a probabilidade das conformações, favorecendo ou o estado fechado ou o aberto do canal.

Os canais, então, são dependentes ou de voltagem, ou de mediadores ou de ATP, ou de Ca²⁺. O ATP é uma energia livre nas reações químicas das células considerado o 'transportador universal' (Cassola, 2000).

No transporte de cloretos o processo de equilíbrio eletroquímico, de fosforilação (reações na membrana para formação ATP, a partir ADP e de fosfato $\{P, P_1\}$), e de mediadores ATP podem ser visualizados na Figura 02.

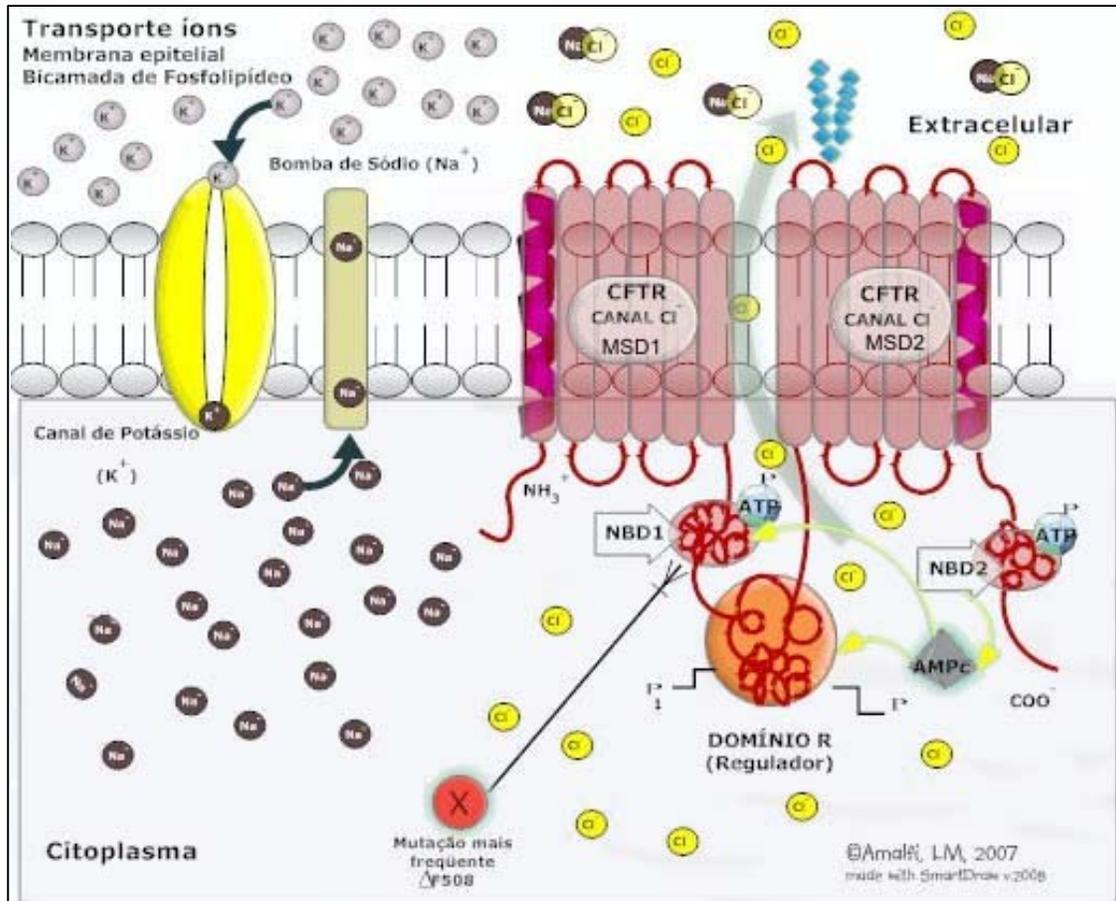


Figura 2- Topologia da proteína CFTR [Baseado em modelos propostos por Nussbaum et al., 2002; Voet e Voet, 2006; Nelson e Cox, 2006]. A estrutura complexa da CFTR possui 12 hélices transmembrana (alfa-helicóidais MSD1 e MSD2) e 3 domínios funcionalmente significativos estendidos a partir da superfície sistólica: NBD1 e NBD2 são domínios de ligação de nucleotídeos aos quais o ATP se liga, e um domínio regulador (R) => sítio de fosforilação pela proteína quinase dependente de AMPc. Cadeias oligossacarídicas ligadas a vários resíduos na superfície externa no segmento entre hélices 7 e 8. A mutação mais freqüente $\Delta F508$ ocorre no domínio NBD1. A água segue o sódio, que são transportadas para fora das células via Na^+/K^+ . Outros íons Na^+ entram pelo ENaC e CFTR. Ligação $[P, P_1]$, fosfato.

1.2.2- Função da proteína CFTR na fibrose cística

A proteína CFTR é integrante da membrana celular e tem a dupla função de ser um canal de cloro e de atuar como um regulador de múltiplos canais de íons e processos celulares adicionais (Silverthorn, 2003).

Segundo Akabas (2000) a regulação da CFTR, consiste em dois processos separados que controlam a passagem no canal: a fosforilação e a ligação e hidrólise do ATP.

O autor descreve que a fosforilação é necessária para a ativação do canal, mas não é suficiente. Após a fosforilação, a passagem entre os estados de abertura e fechamento do canal é controlada pela hidrólise de ATP. Quanto maior a fosforilação, maior é a probabilidade de abertura do canal, sendo que a desativação do canal é mediada por fosfatases protéicas.

A abertura do canal de Cl^- em presença de um agonista, como a acetilcolina, induzindo um aumento do monofosfato de adenosina cíclica (AMPC), seguido pela ativação proteínquinase A, produção de trifosfato de adenosina (ATP), e a ligação do ATP a dois domínios de ligação de ATP do canal de Cl^- (Kierszenbaum, 2004; Nelson e Cox, 2006).

A proteína CFTR atua como regulador de transporte apical de íons por vários mecanismos (Akabas, 2000; Lyzac et al., 2002; Silverthorn, 2003; Oliveira, 2004 Kierszenbaum, 2004 e Nelson e Cox, 2006):

- O primeiro destes mecanismos é a função natural da proteína CFTR como um canal de cloro.
- Segundo, o domínio R da CFTR pode associar e regular a atividade do canal de potássio.
- Terceiro, a CFTR media o transporte de ATP através da membrana plasmática. Este ATP extracelular pode então se ligar ao receptor poligênico que regula a atividade de outro regulador, o “Outwardly rectifying chloride channel” (ORCC) ou canal de cloro que retifica externamente.

- Por último, existem evidências de que a CFTR pode estimular diretamente a atividade de importação de cloreto e reprimir o canal de sódio (ENaC).
- Os canais de sódio (ENaC) são responsáveis pela reabsorção de sódio (acompanhado de água) do líquido de superfície das vias aéreas e são expressos em todo aparelho respiratório, inclusive no epitélio alveolar.

Sendo assim, a reabsorção é importante para manter relativamente constante a quantidade de líquido nas vias aéreas (Oliveira, 2004; Ratjen, 2007).

1.2.3- Papel da proteína CFTR na doença pulmonar

As vias respiratórias em pacientes com FC são caracterizadas por persistentes infecções e excessivas respostas inflamatórias.

Normalmente, as células epiteliais que revestem a superfície interna dos pulmões, secretam uma substância que prendem e matam as bactérias enquanto os cílios das células epiteliais, constantemente, arrastam para fora os restos resultantes (Lodish et al., 2000).

Quando a proteína CFTR é defeituosa ou está ausente, esses processos são menos eficientes e infecções frequentes por bactérias como o *S. aureus* e *P. aeruginosa* danificam progressivamente os pulmões e reduzem a eficiência da respiração (Nelson e Cox, 2006; Gropper e Wiener-Kronish, 2008).

Segundo os autores, a fina camada de muco que normalmente reveste as superfícies internas dos pulmões é, na FC, anormalmente espessa, obstruindo o fluxo de ar e fornecendo um substrato para a fixação de bactérias patogênicas, particularmente *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Johnson (2000) descreveu detalhadamente dois dos mecanismos importantes para remoção de partículas estranhas das vias aéreas: o transporte mucociliar e os macrófagos alveolares.

Segundo o autor, o transporte mucociliar (MCT) remove as partículas estranhas das vias aéreas condutoras. As partículas depositadas no muco são deslocadas na direção da boca pelos batimentos contínuos dos cílios existentes nas células epiteliais das vias aéreas. Os cílios batem cerca de 20 vezes por segundo de maneira coordenada a fim de movimentar o muco para cima e para fora das grandes vias aéreas.

Quando o muco alcança a laringe, pode ser deglutido, sendo assim removidas do sistema respiratório (Silverthorn et al., 2003).

Sendo assim, o muco é uma secreção complexa e desempenha um importante mecanismo de defesa, que consiste em uma camada em gel (superior) e uma camada em sol (inferior). A camada em gel, é viscosa e adere às partículas retidas e depositadas sobre as vias aéreas, contém macromoléculas como a mucina (Johnson, 2000; Silverthorn et al., 2003).

A camada inferior constitui uma secreção menos viscosa que banha os cílios. Portanto, os cílios conseguem movimentar-se facilmente na camada em sol e a camada em gel que flutua na parte superior é deslocada para cima e para fora das vias aéreas (Johnson, 2000; Silverthorn et al., 2003).

Neste contexto, na FC o muco fica desidratado ‘empacotando’ os cílios, impedindo o transporte normal MCT, observados na Figura 3 (Silverthorn et al., 2003; Ribeiro AF et al., 2005; Nelson e Cox, 2006, Gropper e Wiener-Kronish, 2008).

Outros compostos e reações químicas fazem parte da fisiopatogênese da FC no sistema respiratório, como o óxido nítrico (NO) e a hipóxia pulmonar.

O NO é uma molécula com atividade antibacteriana (defesas inespecíficas das vias aéreas), e nos pacientes com FC, existe diminuição da atividade da enzima óxido nítrico-sintetase (NOS-2). Esta diminuição compromete a habilidade de eliminar pequenos inóculos de bactérias, favorecendo o início das infecções (Ribeiro JD et al., 2002).

Neste contexto, o resultante desequilíbrio da relação ventilação/perfusão causa hipoxemia devido às regiões em que o fluxo sanguíneo pulmonar não realiza as trocas gasosas. A hipoxemia que se torna mais acentuada com o passar dos anos, é um forte

estímulo para a vasoconstrição arterial pulmonar. Essa constrição causa hipertensão pulmonar e, quando grave o suficiente, leva ao cor pulmonale (também conhecido como insuficiência ventricular direita). Como a hemoptise, o cor pulmonale tem um prognóstico ruim.

Quanto a citologia pulmonar, fotos reveladas em miografia eletrônica demonstraram que as células de Clara têm sido associadas com a liberação de Cl⁻, mediado por um mecanismo envolvendo o monofosfato guanosina cíclica (GMPC) – guanilato ciclase C (Kierszenbaum et al., 2004).

Alguns estudos sugerem que a excessiva resposta inflamatória, se deve ao epitélio pulmonar (superfície alveolar), que por si só, em seu sistema de defesa, contribua para o dano nas superfícies das vias respiratórias na FC (Gropper e Wiener-Kronish, 2008).

Na FC, o aumento do número de macrófagos, que secretam quimiotáticos que atraem neutrófilos, que acumulam elastase no lúmen, e junto aos macrófagos liberam proteases, que são produtos que degradam as fibras elásticas da parede bronquiolar e alveolar (Kierszenbaum et al., 2004).

Conseqüentemente, uma proliferação TH2 com produção citocinas, como a interleucina IL-8 (marcador imunológico), causa estreitamento das vias aéreas e aumento na produção muco, e, conseqüentemente danos ao tecido pulmonar (Gropper e Wiener-Kronish, 2008).

Segundo os autores, há dois (2) tipos de células do epitélio alveolar: I e II.

As células do tipo I, primariamente, funcionam como barreira (metabolicamente ativa, participa da defesa do hospedeiro, remodelamento alveolar, e funções antioxidantes).

O tipo II consiste em células pequenas (com CFTR) caracterizadas: poder surfactante (grânulos chamados de corpos luminares) atua progenitor, e célula defesa.

O conhecimento sobre as funções destas células e anormalidades poderiam colaborar para desenvolvimento de novas terapias e, talvez, para terapias de reposição celular, um sonho futurista, tanto para pacientes com FC e como para todos que sofrem processos degenerativos pulmonares.

Técnicas em miografia eletrônica revelaram que as Células de Clara secretam um componente do material surfactante que recobre os alvéolos e que representam 80% da população de células epiteliais do bronquíolo terminal (Kierszenbaum et al., 2004).

Novos estudos tem postulado que a resposta hiper-inflamatória do hospedeiro diante das infecções é a chave da patogenia pulmonar na FC (Ribeiro CMP, 2006).

Segundo a autora, a resposta hiper-inflamatória às infecções na FC, é controversa, i. e. se ocorre como resultado de mutações na CFTR e/ou em consequência das infecções persistentes pulmonares.

Em seu estudo, foi demonstrado que sinais de cálcio intracelular (Ca^{2+}_i), conseqüentes da ativação de receptores apicais da proteína conjugada G (GPCRs), pelos mediadores pré-inflamatórios, estão aumentados o epitélio das vias aéreas na FC.

Concluindo, a autora descreveu o aumento do Ca^{2+}_i estocado no RE transmitindo um fenótipo de hiper-inflamação em epitélios cronicamente infectados como resultado da grande mobilização de Ca^{2+}_i associada a uma excessiva resposta conseqüente da ativação da GPCR (Ribeiro CMP, 2006).

A figura 3 ilustra hipoteticamente a cascata de eventos sobre o epitélio pulmonar, baseado nos modelos propostos na literatura especializada. No epitélio pseudo-estratificado cilíndrico (cima para baixo): célula ciliada, células caliciformes (secretoras de muco) e células basais. No bronquíolo terminal o epitélio é cúbico ciliado com células de Clara (sem células caliciformes) (Kierszenbaum et al., 2004).

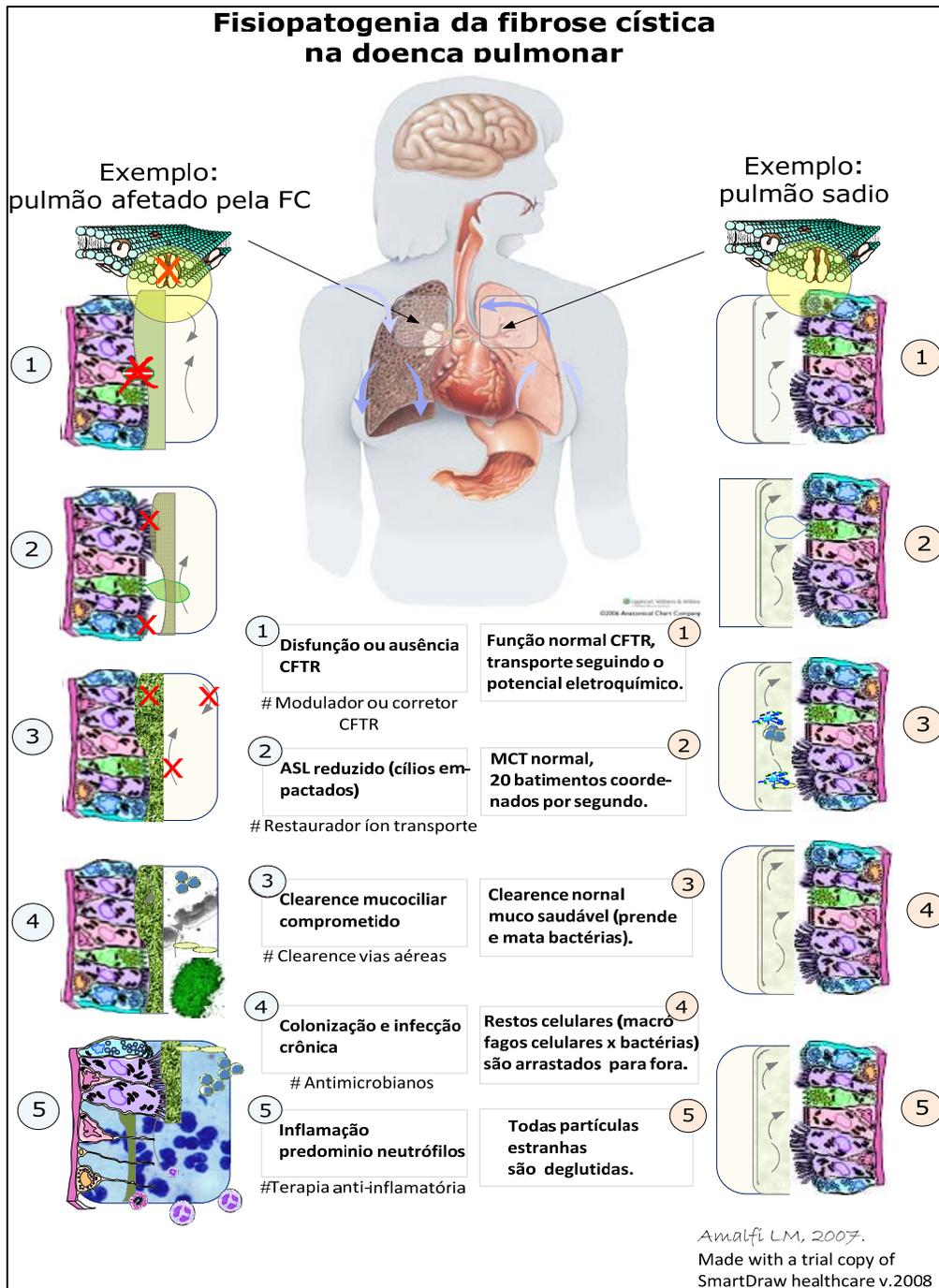


Figura central reproduzida copyright © Lippincott Williams & Winkins, com permissão to trial copy of SmartDraw healthcare v.2008.

Figura 3- Diagrama hipotético baseado nos modelos propostos por Hudson, 2004; Kierszbaum, 2004; Voet e Voet, 2006. Transporte mucociliar (MCT) + macrófagos (grandes células mononucleares superfície alveolar, cujos lisossomos digerem bactérias) → (3) → Via de saída partículas estranhas + restos macrófagos x bactérias → MCT. # terapias sugeridas nas diferentes fases da doença pulmonar na FC.

1.2.4- Mutações no polipeptídeo CFTR – genética da fibrose cística

A primeira mutação da FC identificada foi uma deleção de uma fenilalanina na posição 508 ($\Delta F508$), na primeira dobra de ligação ATP (NBD1; Figura 2), é o defeito mais comum, contribuindo com cerca de 70% de todos os alelos FC nas populações caucasianas (Nussbaum et al., 2002).

Segundo os autores, nas populações caucasianas, apenas outras sete mutações são mais frequentes que 0,5% e, portanto, a maioria é rara.

No Brasil, a prevalência foi baseada em resultados do estudo multicêntrico de Raskin (2001) e em dados do Ministério da Saúde (Brasil, 2003), de aproximadamente 47% a 50% consecutivamente, devido à alta miscigenação de raças e alta heterogeneidade alélica.

Embora as anomalias bioquímicas associadas à maioria das mutações na FC sejam conhecidas, cinco mecanismos gerais das disfunções protéicas foram descritos.

Alguns autores diferem em suas classificações (p. ex., Nussbaum et al., 2002 e Welsh et al., 2001), sob a hipótese de cada um classificá-la conforme sua área de atuação (p. ex., bioquímica e genética); mas em geral, a maioria dos autores concordam que, as mutações da classe I, II e III são as que estão associadas às manifestações clínicas mais graves (Ribeiro AF, 2005).

As mutações da classe I são as que têm um defeito na produção da proteína, tais como as associadas a códons finalizadores prematuros ou mutações que geram RNA instáveis. Como a CFTR é uma proteína glicosada da membrana, ela deve ser processada no retículo endoplasmático (RE) e Golgi para ser glicosada e secretada (Nussbaum et al., 2002).

A classe II (mutação $\Delta F508$), como resultado de processamento defeituoso no enovelamento (dobramento) da proteína no NBD1, sendo que este mutante não se dobra normalmente o suficiente para permitir sua saída do RE (Nussbaum et al., 2002; Nelson e Cox (2006).

Outras mutações produzem uma proteína que é inserida apropriadamente, mas não consegue ser ativada pela fosforilação. Em cada caso, o problema fundamental é um canal de Cl^- que não funciona nas células epiteliais que revestem os órgãos afetados na FC (Nelson e Cox, 2006).

Mais de 1.000 mutações naturais foram identificadas no gene que codifica a proteína CFTR (Ribeiro AF et al., 2005).

Os alelos representativos de cada uma destas cinco classes são mostrados na Figura 4, segundo o modelo proposto por Welsh et al. (2001).

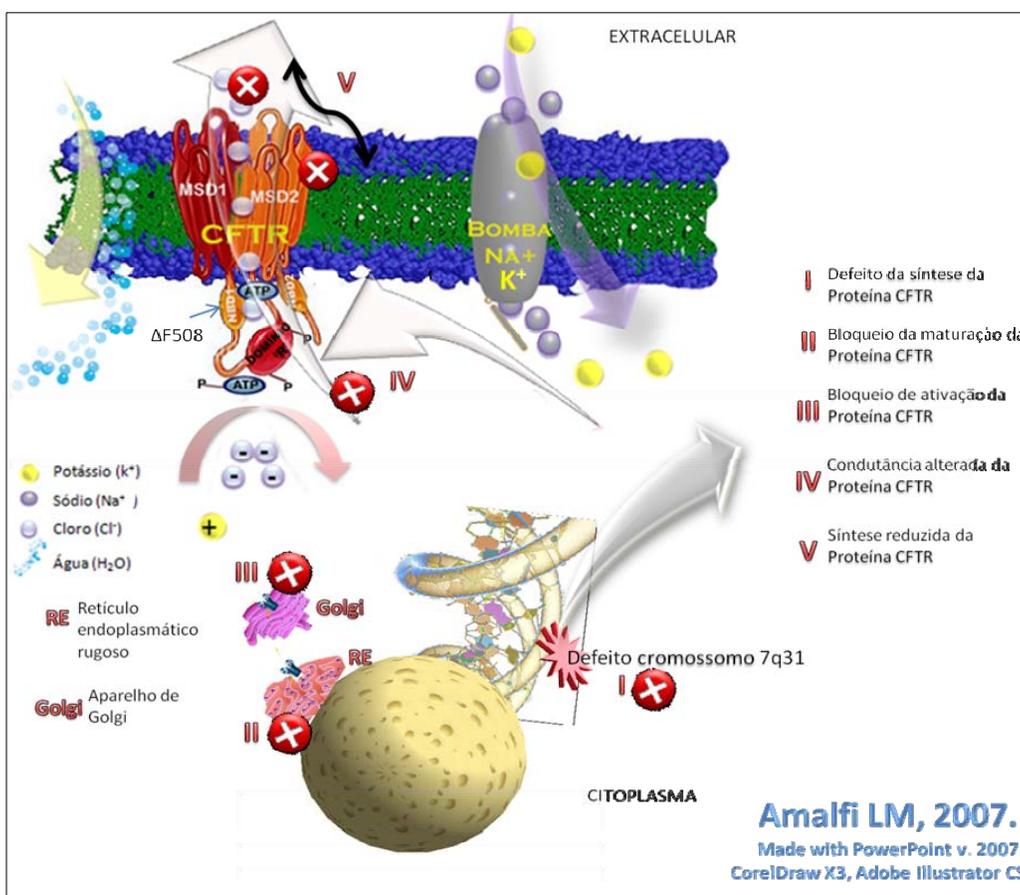


Figura 4- Esquemática hipotética das classes de mutações baseado no modelo proposto por Welsh et al., 2001. Esquema ilustrativo do epitélio pulmonar → ausência de atividade ou funcionamento parcial da CFTR → ↓ excreção Cl^- , → ↑ fluxo de Na^+ e ↑ H_2O intracelular (ação osmótica) → característica muco desidratado. As figuras são meramente ilustrativas: acima → membrana epitelial (permeado por proteínas de transporte iônicas), e abaixo ‘o núcleo’ no centro citoplasma (com seqüência do cromossomo {DNA} alterada na FC, à direita).

1.3- Critérios diagnósticos

1.3.1- Critérios clínicos

Ao nascer, a criança com FC pode não apresentar sinais ou sintomas da doença em semanas, meses ou mesmo anos (Rosenfeld et al., 2001).

Cerca de 5 a 10% pacientes com FC nascem com obstrução intestinal por mecônio, que pode já ser diagnosticado no ultra-som durante a gestação (Brasil, 2003).

Uma das características mais relevantes da FC que, de certa forma dificulta seu diagnóstico, é seu polimorfismo com grande variabilidade na frequência e gravidade das manifestações clínicas e complicações, variando desde o recém-nascido com íleo meconial até o indivíduo adulto com pouca sintomatologia, apresentando quase que exclusivamente azoospermia obstrutiva (Farias et al., 1997; Rosenfeld et al., 2001; Oliveira, 2004).

Os especialistas, Ribeiro JD et al. (2002), Ribeiro AF et al. (2005) e, Mitchell et al. (2006), descreveram as manifestações clínicas, sob os aspectos de suas características morfológicas que são altamente variáveis, que não se expressam nas mesmas intensidades e formas, e depende do (a):

- tipo de glândulas afetadas,
- área envolvida,
- gravidade,
- condições ambientais,
- nutricionais e, imunológicas de cada paciente.

Nussbaum et al. (2001) e Raskin (2001) descreveram alguns dos fatores ambientais como: fumo, poluição ambiental, saneamento básico, aspectos sociais (difícil acesso aos centros de referência), e a idade avançada no diagnóstico (Alvarez et al., 2004), como fatores externos que interferem na evolução e na gravidade da doença.

A infecção crônica do trato respiratório é uma das manifestações clínicas predominantes da FC e é responsável por 75 a 85% das mortes entre os pacientes. Conseqüentemente, a doença pulmonar é a principal responsável pela morbidade e mortalidade dos pacientes com FC, sendo que, em 90% dos casos, o óbito ocorre por insuficiência respiratória (Morales e Fernandez, 1997; Ribeiro JD et al., 2002; Ribeiro AF et al., 2005; Mitchell et al., 2006; Nelson e Cox, 2006).

Como a FC apresenta uma marcada heterogeneidade sob o ponto de vista pulmonar, alguns afetados apresentam apenas na vida adulta quadros rotulados como “bronquite” ou tosse persistente, podendo manter uma função pulmonar razoável durante a quarta década ou quinta década de vida (Raskin, 2001).

O que significa que a FC, freqüentemente, apresenta uma constelação típica de sintomas, incluindo infecções respiratórias crônicas e anormalidades gastrintestinais, levando a uma má absorção e déficit nutricional, portanto é responsabilidade do pediatra geral estar alerta para as manifestações clínicas da FC, para melhor orientar os exames diagnósticos (Ribeiro JD et al., 2003; Ribeiro AF et al., 2005).

Se infectados, o tratamento irá depender das características dos microrganismos (resistência aos antibióticos e condições ambientais), e o prognóstico de suas condições nutricionais e imunológicas (Ribeiro AF et al., 2005).

De um modo geral, as principais manifestações clínicas estão descritas na Figura 5.

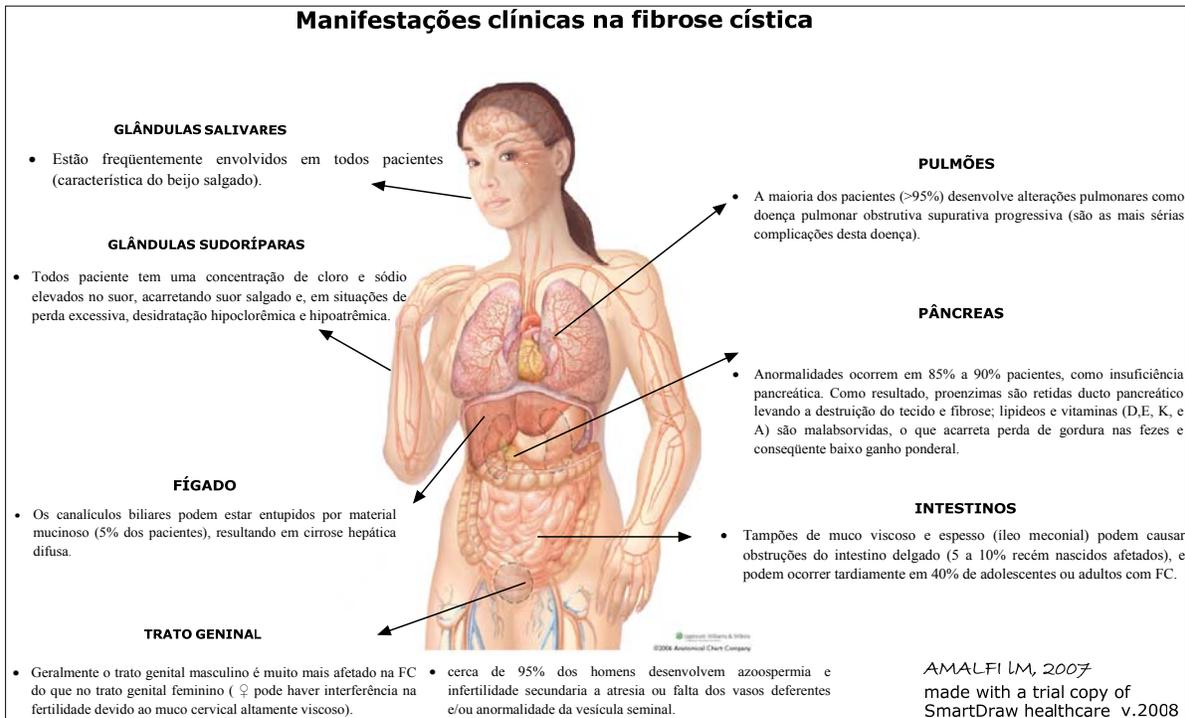


Figura central reproduzida com permissão copyright © Lippincott Williams & Wilkins to trial copy of SmartDraw healthcare v.2008.

Figura 5- Diagrama baseado nas publicações [Ribeiro JD et al., 2002; Ribeiro AF et al., 2005; Mitchel et al., 2006].

1.3.2- Critérios laboratoriais

1.3.2.1- Triagem neonatal (teste do pezinho)

Segundo Cabello et al. (2003) a triagem neonatal (TN) para FC, tem sido assunto de discussão e um dilema na comunidade médica, nos últimos 10 anos; porém, como o diagnóstico e o tratamento sintomático precoce influem no prognóstico final; parece lógica a realização do rastreamento neonatal, que foi recentemente recomendado pelo Ministério da Saúde através da dosagem da Tripsina Imunorreativa (IRT).

Além disso, o diagnóstico precoce tem proporcionado aos profissionais que acompanham essas crianças, um melhor conhecimento sobre a doença e sua história natural e, aos pais, procederem aos cuidados no primeiro ano de vida e a oportunidade do planejamento familiar (Santos, 2005).

Porém Ribeiro JD et al. (2002, 2003) alertam para a necessidade de realização de novos trabalhos científicos randomizados e bem conduzidos, que possam demonstrar a real eficiência de programas de triagem neonatal para FC, principalmente por não dispormos ainda de métodos com maior sensibilidade e especificidade.

Segundo os autores, o tema continua sendo controverso, pois tais procedimentos são mais utilizados para avaliar prevalência de determinadas doenças, do que para avaliar a evolução da doença.

Farrel e Farrel (2001, 2003) evidenciaram em seus estudos, o benefício da triagem neonatal para FC. No estudo de 2003, os autores avaliaram os diagnósticos post-mortem de crianças sem o diagnóstico de FC, estimados em 5% de hipoatrêmicos, e em maior porcentagem de desidratados, desnutridos, e com falência respiratória fatal.

1.3.2.2- Teste do suor

O termo de teste do suor refere-se à análise quantitativa e qualitativa, para determinar a concentração de eletrólitos no suor, condutividade, ou osmolaridade confirmando o diagnóstico de FC (Legrys, 1996).

É considerado o padrão ouro para diagnóstico da FC, segundo o “Consensus of Cystic Fibrosis Foundation”. Uma concentração de cloreto acima de 60 mEq/litro é dada como resultado positivo, quando determinado em duas ou mais ocasiões pela análise iônica quantitativa de suor estimulada através da iontoforese por pilocarpina e dosagem de cloro e sódio (Lyczac et al., 2002).

É um exame de baixo custo, com elevada sensibilidade e especificidade e não invasivo (Ribeiro JD et al., 2002).

O teste do suor deve ser feito, preferencialmente, em duas dosagens e/ou identificação de mutações conhecidas da FC em ambos os alelos. Este teste é realizado após 30 dias de vida e a quantidade mínima de suor necessária é de 100mg, o que dificulta a realização do exame nos recém-nascidos (RN). Sempre que a condição clínica for sugestiva, o exame do suor deve ser repetido (Legrys, 1996).

Segundo Neto Camargo et al. (1999), quando houver forte suspeita diagnóstica e o exame do suor for negativo, o caso deve ser avaliado individualmente. O exame do suor deve ser realizado em laboratórios de referência com experiência e realização rotineira por ser um teste artesanal e conseqüentemente técnico dependente (Neto Camargo et al., 1999).

- Valores de cloro superiores a 60 mEq/L são considerados positivos,
- 40-60 mEq/L são limítrofes e devem ser repetidos,
- Abaixo de 40 mEq/L são considerados negativos.

Segundo Legrys (1996) deve-se tomar cuidado com as causas de erros como falso-positivo: anorexia nervosa, dermatite atópica, disfunção autonômica, mucopolisacaridose, desnutrição calórica de proteína, hipotireoidismo tratado, e outros, eczema, dermatoses, etc.

Também em relação à metodologia, o autor relatou possíveis erros de técnica ou evaporação por demora no processamento do exame.

Deve-se ter atenção redobrada ao se deparar com as causas de falso-negativo: edema, quantidade insuficiente de suor, erros técnicos e metodológicos.

Segundo Quinton, em sua revisão no tema, a glândula do suor não só tem o principal papel em diagnosticar, como em compreender a fisiopatogênese, os conceitos, e também como os efeitos da doença em órgãos, em tecidos, e em moléculas (Quinton, 2006).

1.3.2.3- Estudo genético

Estudos genéticos em FC, através da identificação de mutações cromossômicas, têm contribuído para a elucidação diagnóstica, principalmente nos casos de suspeita clínica e com testes do suor negativo e/ou duvidosos (Cabello et al., 2003).

Análise genética das mutações em FC tem alto custo, alta sensibilidade, porém baixa especificidade por conta do grande número de mutações, como as descritas por Welsh et al. (2001) e por Raskin (2001) em seu estudo no Brasil.

Segundo o “Cystic Fibrosis Trust” (2001), a capacidade do genótipo de prever a gravidade da doença está diretamente relacionada ao órgão acometido. Quando as glândulas sudoríparas, pâncreas e sistema reprodutor são acometidos, existe uma forte correlação entre genótipo e fenótipo. Ao contrário, quando o órgão acometido é o pulmão, há uma grande dificuldade em se estabelecer esta correlação.

A identificação de duas mutações conhecidas confirma o diagnóstico de FC, sendo decisivo naquele paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor não conclusivo (Morales e Fernandez, 1997; Hudson, 2004). No Brasil, são poucos os centros capacitados para realizá-la (Ribeiro JD et al., 2002; Ribeiro AF et al., 2005).

No estudo de Alvarez et al. (2004) no HC/Unicamp, a frequência da mutação $\Delta F508$ chegou a 50% dos casos, assim como no estudo de Raskin (2001) a frequência chegou a 47%. Segundo Raskin (2001) a menor incidência dessa mutação, em nosso meio, é quando comparada aos dados dos Estados Unidos, França e Argentina; provavelmente ocorre devido à grande miscigenação de raças no Brasil.

Estudo recente no HC/Unicamp, junto ao Departamento de Genética, observou-se frequências semelhantes ao estudo de Alvarez (2004). Neste estudo, a mutação $\Delta F508$ esteve presente em 50% dos alelos, e a frequência de outras mutações como a G542X em 4,29%, a R553X em 0,71%, a R1162X em 2,14%, a N1303 em 1,43% e a G551D não foi detectada. Estas mutações encontradas delinearam um perfil das mutações de maior prevalência nos pacientes da região de Campinas (Correa, 2004).

1.3.2.4- Outros critérios laboratoriais

Como a FC pode afetar vários órgãos, muitos outros testes, além do teste do suor, podem ser realizados para a orientação do diagnóstico (Kroll e Terra, 1999):

- A determinação dos níveis de enzimas pancreáticas, que estão reduzidos.
- A análise das fezes do paciente pode revelar níveis diminuídos ou ausentes de tripsina e quimiotripsina ou níveis elevados de gordura e elastase fecal.

- Quando a secreção de insulina estiver reduzida, os níveis de açúcar no sangue são altos.
- Testes de função pulmonar podem mostrar comprometimento respiratório e a radiografia de tórax também pode sugerir a doença.

1.3.2.4.1- Elastase fecal

O termo de “suficiência pancreática” é usado para descrever pacientes que têm perdas de reservas pancreáticas e não demonstram sinais de má-digestão (Gullo et al., 1999).

O pâncreas exócrino tem uma larga capacidade funcional: mais de 98% do resíduo funcional necessita ser perdido para que sinais e sintomas de má-digestão de gorduras manifestem-se (Bebarry et al., 2002).

A função exócrina do pâncreas é de difícil avaliação em razão de sua anatomia pouco acessível e capacidade de reserva. O “Gold Standard” teste seria a estimulação direta do pâncreas, mas não é usado extensamente na prática clínica, por ser extremamente complexo, caro, e invasivo (Borowitz et al., 2004).

A elastase fecal (E1) é um teste, facilmente obtido para classificar o *status* pancreático nos pacientes com FC. Esta informação é importante para o prognóstico, tratamento e deve transformar-se em padrão para o cuidado para pacientes com FC (Borowitz et al., 2004).

Por ser um método sensível (96%) e específico (100%) para FC, possibilitaria assim comparar a efetividade das provas laboratoriais e diminuir os danos causados pela não inclusão de fibrocísticos por resultados falso-negativos, ou pela alta porcentagem da inclusão na primeira fase da triagem, de pacientes com testes falso-positivos no protocolo IRT/DNA (Gullo et al., 1999; Bebarry et al., 2002; Borowitz et al., 2004; Cabello et al., 2003; Ribeiro JD et al., 2003).

Em fase de gestão no HC/Unicamp, projeto piloto aprovado no CEP da FCM, propôs aliar o teste do pezinho ao teste da elastase fecal (E1), para detecção precoce e estudo de eficiência técnica, em recém-nascidos na região do estado São Paulo, DIR XV Piracicaba (28 cidades) (Amalfi et al., 2005).

1.4- Microbiologia da fibrose cística

A suscetibilidade a infecções pulmonares crônicas em pacientes com FC tem sido reconhecida desde as primeiras descrições da doença (Kroll e Terra, 1999).

Segundo Ferkol et al. (2006) é notório que pouco se sabe sobre o mecanismo da fisiopatogênese das exacerbações pulmonares. Recentemente, é conhecido que há uma complexa interação entre epitélio respiratório, células do sistema imune, e bactérias que fazem parte do centro do processo de exacerbação. Mas o mecanismo celular 'preciso' permanece para ser elucidado.

Além disso, observou-se, que, ao nascer, os pulmões dos pacientes com FC, são livres de patologia, sugerindo que o diagnóstico precoce através do teste do pezinho, acompanhados aos cuidados monitorados do sistema respiratório (tosse, infecções), juntamente com as radiografias pulmonares, poderiam proporcionar melhores resultados.

Comumente era aceita como resultado do aumento de bactérias endobrônquicas, a associação à resposta inflamatória do hospedeiro. Sendo que marcadores inflamatórios estão reduzidos nas secreções respiratórias de exacerbações em FC, após terapia antibiótica agressiva (Smith et al., 1999; Ordonez et al., 2003).

No sistema respiratório, o trato superior é colonizado por uma grande variedade de microrganismos que incluem a micro biota normal enquanto o trato respiratório inferior é mantido em um estado estéril pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Kroll e Terra, 1999).

Estes defensores consistem em barreiras físicas e barreiras endocíticas e fagocíticas. A falha em qualquer dessas barreiras resulta na suscetibilidade à infecção pulmonar (Mims et al., 1995; Lyczak et al., 2002).

A infecção pulmonar crônica de pacientes com FC está normalmente associada a um número limitado de microrganismos. Dois patógenos principais, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são os mais recuperados do trato respiratório em pacientes cronicamente doentes (Murray et al., 2000).

Outros microrganismos encontrados em algum grau de frequência no trato respiratório dos pacientes com FC incluem *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae*. (Gilligan, 1991).

O papel de outros patógenos como as micobactérias não tuberculóides, vírus e fungos, especialmente *Aspergillus spp*, tem sido observado pelos pesquisadores em busca de uma correlação com as doenças pulmonares de pacientes com FC (Gilligan et al., 2006).

Segundo Rozov (1999) outros microrganismos podem ser isolados das secreções de pacientes com FC, incluindo bactérias aeróbias como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, *Serratia sp* e ainda bactérias anaeróbias, porém não representam papel importante em FC.

Até o advento da antibioticoterapia, a maioria dos pacientes com FC morria ainda na infância devido a infecções estafilocócicas (Gilligan, 1991).

Recentemente, diante dos avanços em antibioticoterapia, os novos pacientes diagnosticados podem chegar a ter a expectativa de atingir a idade adulta. Além disso, a terapia antibiótica agressiva com aumento da oferta de novos antibióticos tem contribuído para o controle das infecções por *S. aureus* e *H. influenzae*. Em contraste, o uso dos microrganismos antipseudomonas raramente resulta na erradicação da *P. aeruginosa* (Gilligan et al., 2006).

Neste contexto, a *P. aeruginosa* é, atualmente, o microrganismo mais isolado em escarro de pacientes com FC. A idade de aquisição de *P. aeruginosa* varia a partir da infância até a idade adulta e a colonização crônica ocorre, frequentemente, na adolescência, estando comumente associada ao declínio progressivo da função pulmonar (Saiman e Siegel, 2004).

Esta bactéria emergente tem sido reconhecida como o patógeno oportunista de maior significado clínico humano, durante os últimos 60 anos, conseqüência de uma resistência aos antibióticos e desinfetantes que eliminaria qualquer outro tipo de bactéria ambiental. Também é a causa predominante da morbidade e mortalidade em pacientes com FC, em que as membranas epiteliais das vias aéreas estão comprometidas, levando a colonização permanente dos pulmões pela *P. aeruginosa* (Stover et al., 2000).

Segundo Barth (2005) em sua pesquisa com pacientes com FC no HC/Unicamp, observou-se elevada prevalência para *H. influenzae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e fungos, sendo que o acometimento de *P. aeruginosa* quanto à faixa etária foi precoce.

Segundo o autor, os resultados de seu estudo quanto à prevalência e acometimento diferem dos resultados descritos em literatura, mas em relação à incidência de *B. cepacia*, observou-se uma semelhança aos estudos descritos na literatura.

Vários estudos têm sugerido que a inflamação e a infecção bacteriana podem começar em uma idade precoce antes dos sintomas aparecerem. Portanto, há um interesse considerável em determinar a contribuição da infecção e inflamação precoce para o progresso da doença pulmonar em FC (Lyczak et al., 2002).

Neste contexto, o diagnóstico e o tratamento precoce das infecções pulmonares são particularmente importantes em pacientes jovens, uma vez que instituído precocemente a antibióticoterapia correta, pode-se evitar ou retardar a colonização por esse microrganismo (Ferkol, et al., 2006).

A correlação entre a exacerbação dos sintomas pulmonares e a contagem de colônias de bactérias na cultura rotina diagnóstica (CRD) das amostras dos pacientes com FC serve para orientar o controle das infecções (Ferkol et al., 2006)

Juntos, os estudos do modo de aquisição das bactérias que causam infecções em pacientes com FC, a correta e eficaz identificação desses microrganismos e o controle da infecção paciente-a-paciente, possibilitam combater essas infecções, retardar a colonização e manter a boa função pulmonar (Saiman e Siegel, 2004).

1.4.1- *Staphylococcus aureus*

O nome *Staphylococcus aureus* é derivada da palavra grega *staphylé*, que significa “cachos de uva”, referindo-se de que as células desses cocos gram-positivos crescem semelhantes a cachos de uva, entretanto pode aparecer como células isoladas (Murray et al., 2004).

Os estafilococos são germes aeróbios, imóveis, Gram-positivos, freqüentemente isolados em espécimes clínicos e do ambiente. Embora sejam freqüentemente considerados microrganismos comensais (ou seja, fazem parte da flora normal não-patogênica) quando encontrados em FC podem causar doenças bastante graves (Mims et al., 1999).

No gênero da espécie dos estafilococos, as espécies mais comumente associadas à doença humana são o *Staphylococcus aureus* (membro mais virulento e bem conhecido pelos infectologistas e clínicos) (Murray et al., 2004).

Na era pré-antibiótica, o *Staphylococcus aureus* era o primeiro microrganismo a causar infecções crônicas em pacientes jovens com FC. Infecções pulmonares devido a esse microrganismo era a principal causa de mortalidade (Gilligan et al., 2001).

Atualmente, o *S. Aureus* continua como um dos principais patógenos na FC, especialmente nos pacientes com menos de 10 anos (Saiman e Siegel, 2004).

1.4.1.1- Epidemiologia e impacto clínico

Os estafilococos são ubíquos. Todas as pessoas possuem estafilococos coagulase-negativa sobre a pele, e é comum a colonização transitória (Mims, 1995).

As características dos estafilococos auxiliam na compreensão de sua patogenicidade, a qual se apresenta de varias formas. Eles crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade (Tortora et al., 2003).

Alguns pacientes tornam-se cronicamente infectados com estes microrganismos, enquanto outros podem ser somente portadores (Saiman e Siegel, 2004).

Antes do advento da antibioticoterapia, não estava claro se a infecção precoce do *S. aureus*, era devido a um defeito primário do sistema imune inato dos pulmões, ou se secundário a outro aspecto da FC como a má nutrição (Gilligan, 1991).

Dados recentes demonstram a importância do papel primário da patogenia do *S. aureus* na doença pulmonar da FC, mas que ainda precisam ser esclarecidos (Ferkol et al., 2006) .

O uso da terapia antiestafilocócica em várias partes do mundo levantou a questão sobre o tratamento profilático que pode aumentar a suscetibilidade a infecções por outros microrganismos como *H. influenzae* e *P. aeruginosa* (Kroll e Terra, 1999; Lyzac et al., 2002).

A colonização crônica por *P. aeruginosa* é reduzida em regiões onde a terapia antiestafilocócica é administrada estritamente em uma base necessária, não profilática (Lyczak et al., 2002).

Neste contexto, ações quimioprofiláticas para o *S. aureus*, só é bem sucedida em pacientes que não estão hospitalizados; caso contrário, é comum haver hiper-infecção de *P. aeruginosa* (Brooks et al. 2000).

Isolados clínicos resistentes às Penicilinas estáveis (oxacilina) estão sendo reconhecidas com alta frequência nos pacientes com FC (Brooks et al., 2000).

Estudos moleculares epidemiológicos mostram que pacientes com *S. aureus* oxa-resistente (MRSA), frequentemente adquirem o microrganismos quando são hospitalizados, provavelmente devido às diferenças na idade, severidade da doença, exposição a antibióticos, e aquisição associada a tratamentos profiláticos (Miller e Gilligan, 2003).

Nos últimos anos, *S. aureus* oxa-resistente foi considerado a causa do crescente número de infecções oportunistas (pacientes com FC, frequentemente internados para descolonização, com septicemia e ao uso de cateteres) (Murray et al., 2004).

Portanto, a importância clínica tem variado ao longo dos anos, particularmente, devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes (Trabulsi e Alterthum, 2005).

Segundo Saiman e Siegel (2004), alguns pacientes tornam-se cronicamente infectados com estes microrganismos enquanto outros podem ser somente portadores, e segundo Madigan et al. (2004) os estafilococos podem formar biofilmes.

1.4.1.2- Patogenia e imunidade

A patogenia e imunidade estão ligadas aos fatores de virulência específicos de cada microrganismo em seu hospedeiro (Koneman et al., 2001).

Os fatores específicos relacionados às infecções estafilocócicas na FC são pouco compreendidos. A crescente viscosidade das secreções aéreas e o reduzido “clearance” mucociliar podem ser significativos, mas não explicam necessariamente a seletividade do *S. aureus* (Kroll e Terra, 1999).

Segundo Trabulsi e Alterthum (2005), os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes de superfície celular e toxinas. Algumas evidências sugerem que determinadas enzimas também podem estar ligados a patogenia.

Foi descoberto, além disso, que o *S. aureus* na FC, também se liga mais intensamente às células epiteliais escamosas nasais e bucais. Esses resultados aparentemente indicam a existência de cepas de *S. aureus* que aumentaram a capacidade de afinidade em atingir as células de FC, e não que as células de FC tenham receptores seletivos para *S. aureus* (Barth e Pitt, 1998).

Além da aderência, *S. aureus* dispõe de uma variedade de outros fatores de virulência, assim como leucocidinas, catalase e proteína A, que sugerem evadirem a resposta do hospedeiro, bem como as hemolisinas, coagulase e várias outras toxinas que contribuem para a sua patogenicidade (Gilligan, 1991).

Os fatores de virulência implicados na patogenia do *S. aureus* podem ser visualizadas na Figura 06, que incluem pelo menos cinco (5) toxinas citolíticas ou produtoras de lesão de membrana (leucocinas alfa, beta, delta, gama e Panton-Valentine [P-V]), duas enzimas esfoliativas, oito enterotoxinas, e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Murray et al., 2004).

O fator *clumping* é um componente da parede celular dos *S. aureus* que permite a ligação ao fibrinogênio e formar agregados que dificultam a fagocitose (Sentry, 2002).

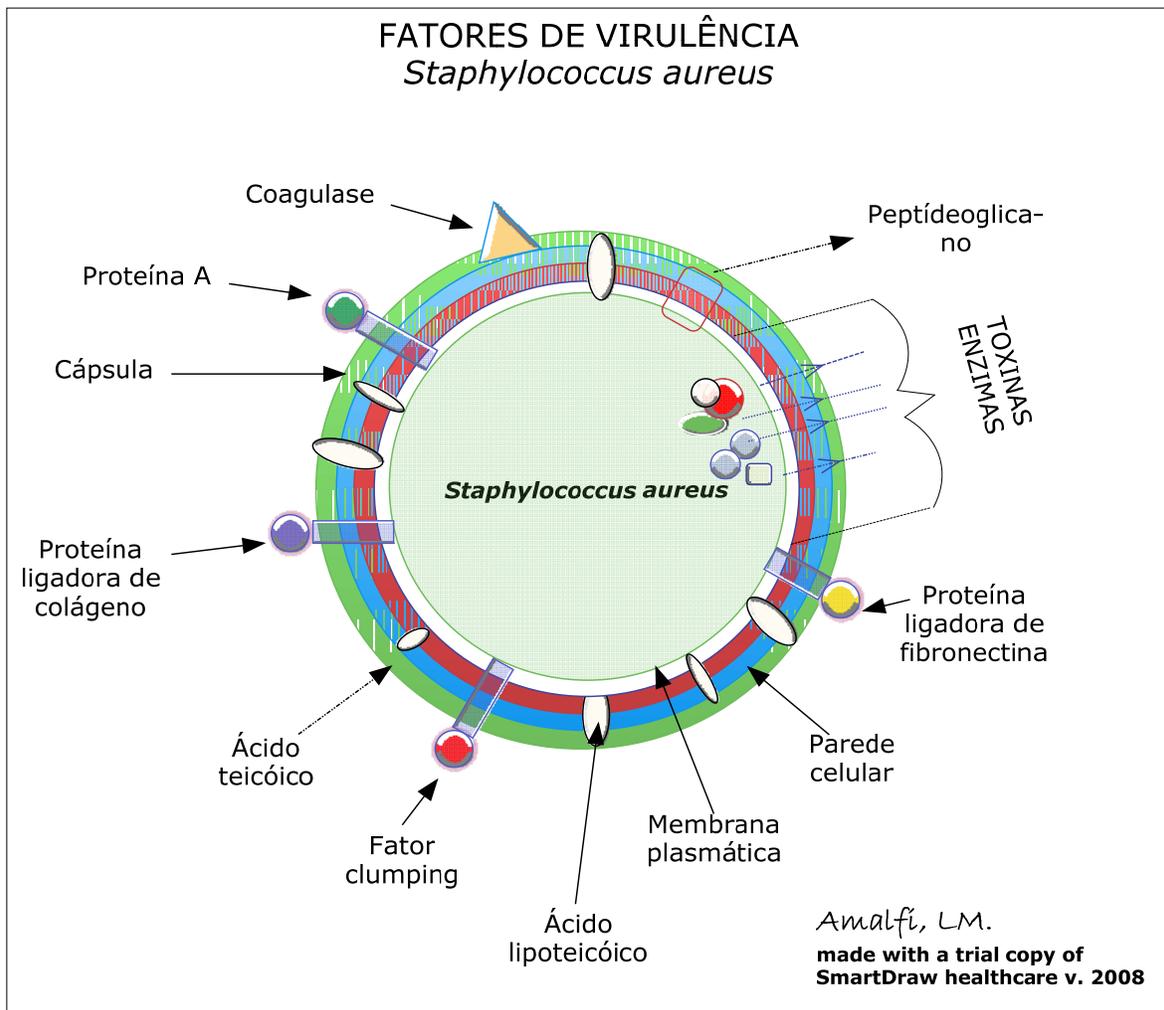


Figura 6- Diagrama baseado no modelo proposto por Brooks et al., 2004. A estrutura antigênica do *S. aureus* é um importante fator de virulência → barreira seletiva da camada peptídeoglicano, membrana plasmática e parede celular

1.4.1.3- Transmissão e vias de aquisição

A transmissão paciente-a-paciente pode ocorrer com *S. aureus*. Tanto a transmissão das cepas oxa-sensíveis (MSSA) ou das cepas oxa-resistentes (MRSA) se dá entre pacientes com FC ou até mesmo sem FC, principalmente MRSA entre pacientes hospitalizados (Saiman e Siegel, 2004).

Segundo Brooks et al. (2004) pacientes com *S. aureus* ativo e portadores de cepas multiresistentes aos antibióticos, deveriam ser tratados separadamente, afastados de centros de tratamento intensivo, e áreas hospitalares de grande risco como: neonatal, UTI, centro cirúrgico, e centros de quimioterapia ao câncer.

1.4.2- *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do gênero *pseudomonas* são aeróbias, não formadoras de esporos, bacilos Gram-negativos retos ou levemente curvos. São móveis devido à presença de um ou mais flagelos polares. Os microrganismos não são fermentadores e utilizam relativamente poucos carboidratos (por ex., glicose, ribose, gliconato) durante o metabolismo oxidativo (Koneman et al., 1997, 2001; Kiska e Gilligan, 2003).

A maioria das espécies é mesófila com crescimento ótimo em temperaturas entre 30 e 37°C (Barth e Pitt, 1998).

A *P. aeruginosa* é o patógeno humano mais importante do gênero *pseudomonas*. Os pacientes com FC uma vez infectados por esse patógeno, raramente são descolonizados. Os membros do grupo fluorescente do gênero *pseudomonas*, entre eles *P. aeruginosa*, produzem pioverdina, um pigmento amarelo-esverdeado ou amarelo âmbar solúvel em água que é fluorescente em um curto comprimento de onda UV (Kiska e Gilligan, 2003; Miller e Gilligan, 2003).

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* são reconhecidos em isolamento primário com base na morfologia e características coloniais, produção de pigmentos difusíveis e odor de uva (Madigan et al., 2004; Trubulsi e Alterthum, 2005).

A *P. aeruginosa* produz outros pigmentos além da pioverdina, dentre eles, a piocianina, principal pigmento e único apresentado somente por *P. aeruginosa* e a piorrubina. Essa espécie pode ser identificada através da reação da oxidase positiva, crescimento a 42°C e produção de pigmento em ágar-Mueller-Hinton (Madigan et al., 2004).

Com o advento da antibioticoterapia estafilocócica, *P. aeruginosa* emergiu como o principal patógeno em doenças pulmonares de pacientes com FC (Gilligan, 1991).

A presença de anticorpos antipseudomonas pode sugerir que a bactéria está presente no trato respiratório do paciente com FC. Existe uma boa correlação entre culturas respiratórias e altos níveis de anticorpos anti-*P. aeruginosa* (Ferkol, et al., 2006).

Segundo estes autores, por outro lado, um nível normal de anticorpos sugere que não houve invasão tecidual por *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, não houve resposta imune. Nestas circunstâncias, se as culturas são negativas, é pouco provável que *P. aeruginosa* esteja contribuindo com os problemas respiratórios, ou seja, com a exacerbação pulmonar do paciente, caso contrário, seria indicativo de colonização invasiva.

Estudos demonstraram que as infecções por *P. aeruginosa* em pacientes com FC podem ser verificadas desde a infância (Miller e Gilligan, 2003).

A infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* e o acompanhamento da resposta inflamatória são hoje claramente os maiores problemas clínicos para o paciente com FC. Durante a última década, a proeminente contribuição da inflamação para a destruição tecidual e perda da função tem sido observada em numerosos estudos (Govan e Deretic, 1996).

Existe produção pronunciada de anticorpos pelo sistema imune do paciente com FC em resposta à colonização inicial por *P. aeruginosa*. A resposta imune humoral dos pacientes com FC é normal, pois formam anticorpos eficientes contra ambas as proteínas e antígenos polissacarídeos de *P. aeruginosa*. A resposta imune humoral aumentada em alguns pacientes com FC está associada a um pior prognóstico (Barth e Pitt, 1998).

Segundo os autores, vários fatores do hospedeiro que representam componentes do sistema imune inato são estimulados por *P. aeruginosa* no pulmão com FC, mas eventualmente eles falham. A falha na defesa atribuída ao hospedeiro pode estar relacionada aos alelos mutantes do gene *CFTR*.

No entanto, fatores da bactéria também contribuem aparentemente para a resposta imune inata inadequada na eliminação de *P. aeruginosa* do trato respiratório.

Barth e Pitt (1995) investigaram o fenômeno de auxotrofia (deficiência nutricional) em cepas de *P. aeruginosa*. Neste estudo, entre os pacientes com FC, a prevalência e cepas nutricionalmente deficientes foram estabelecidas conforme suas capacidades de crescimento em meios de cultura complexos e mínimos. Foi possível isolar cepas autotróficas em 50% pacientes com FC e apenas em 0,5% de pacientes não fibrocísticos.

Foi determinado, através da técnica de cromatografia em camada delgada, que as diferenças quantitativas entre o conteúdo de aminoácidos de escarros de diferentes pacientes com FC, não se devia a presença ou ausência de um único aminoácido. Foi usada a técnica de satelitismo para se demonstrar a possível origem dos aminoácidos livres no escarro de pacientes com FC (Barth e Pitt, 1995).

Neste estudo, observou-se que além de uma variedade de aminoácidos requeridos, bem como a heterogeneidade fenotípica da *P. aeruginosa* auxotrófica de pacientes com FC, sugeriu-se que o mecanismo de seleção destas formas nutricionalmente deficientes é muito complexo.

No entanto, sugeriu-se que a emergência de cepas auxotróficas *in vivo* se deva a um mecanismo adaptativo o qual, provavelmente, foi iniciado e mantido devido ao excesso de aminoácidos livres nos pulmões dos fibrocísticos (Barth, 1995).

1.4.2.1- Epidemiologia e impacto clínico

A *P. aeruginosa* é também o patógeno mais comum e clinicamente importante em pacientes com FC, do gênero pseudomonas. Na idade adulta, mais de 80% dos pacientes estão infectados ou colonizados com este patógeno, afetando a função pulmonar (Mims, 1995).

Segundo Brooks et al. (2004) o *P. aeruginosa* é invasiva e tóxica, causando infecções graves em pacientes com FC, reconhecido também como um importante patógeno nosocomial.

Crianças infectadas com *P. aeruginosa* possuem função pulmonar deficiente, piores escores radiológicos e tempo de sobrevivência menor do que crianças não infectadas.

A maioria dos pacientes carrega o mesmo clone de *P. aeruginosa* durante sua vida. Porém, um único paciente pode possuir mais de um clone. Pacientes que são tratados com terapia antibiótica para erradicar *P. aeruginosa* podem ter infecções recorrentes com a cepa inicial após supressão transitória (Saiman e Siegel, 2004).

Porém, recentemente, relatos de Ferkol et al. (2006) e Aaron et al. (2004), demonstraram que as exacerbações em pacientes cronicamente infectados com *P. aeruginosa*, são provenientes de mais de uma expansão clonal das colônias dos microrganismos presentes nos pacientes estáveis, do que a aquisição de novas colônias.

Microrganismos como a *P. aeruginosa*, podem crescer sobre as superfícies no interior de biofilmes. Os biofilmes correspondem a microcolônias de células bacterianas aderidas a uma superfície e envoltas por polissacarídeos adesivos excretados pelas células (van Ewijk et al., 2005).

Os biofilmes aprisionam os nutrientes necessários ao crescimento da população bacteriana e dificultam o destacamento das células das superfícies em sistemas de fluxo coerente (demonstrado através microscopia a *laser* de varredura confocal) (Yan et al, 2001).

A comunicação intercelular é crítica para o desenvolvimento e manutenção de um biofilme. Em *P. aeruginosa*, um microrganismo notório formador de biofilmes, na qual as principais moléculas sinalizadoras correspondem a compostos denominados *homoserina lactonas* (Tortora et al., 2003; Trabulsi e Altherthum, 2005).

Segundo os autores, à medida que estas moléculas se acumulam, elas agem como agentes quimiotáticos, recrutando células de *P. aeruginosa* presentes nas adjacentes (mecanismo denominado *sensor de quorum*), desenvolvendo assim um biofilme.

Biofilmes de *P. aeruginosa* implicados na doença da FC, possuem propriedades altamente coesivas provocando os sintomas da pneumonia. As bactérias situadas no interior de um biofilme estão protegidas do ataque pelo sistema imune, e, freqüentemente, os antibióticos e outros agentes antimicrobianos (Madigan et al., 2004).

A grande maioria dos estudos epidemiológicos de *P. aeruginosa* tem como objetivo prover informações em três maiores tópicos:

- a origem da aquisição das cepas,
- o mecanismo da persistência das cepas e,
- a existência de infecção cruzada entre os pacientes.

1.4.2.2- Patogenia e imunidade

As pseudomonas possuem numerosos fatores estruturais e toxinas que aumentam a sua virulência (adesinas, produção de alginato, exotoxina A, exotoxina S, atividade elastolítica, fosfolipase C, e piocianina), além de torná-las resistentes aos antibióticos mais comumente utilizados.

Outras estruturas antigênicas são fatores importantes de virulência, como o *Pili* (fimbriae) sobre a superfície da célula que promove a agregação (Brooks et al., 2004).

Sobre o *Pili*, Trabulsi e Alterthum (2005) acrescenta que a *P. aeruginosa* produz uma fimbria do tipo 4 que media sua adesão às células epiteliais, considerada como a principal adesina associada à virulência (90% capacidade adesão).

A camada de lipopolissacarideo com múltiplos imunotipos, também é responsável por muitas das propriedades endotóxicas do microrganismo (Brooks et al., 2004).

A virulência da *P. aeruginosa* é multifatorial (componentes estruturais, toxinas e enzima) (Trabulsi e Altherthum, 2005), e a gravidade das infecções das vias aéreas inferiores por *P. aeruginosa* pode variar desde uma colonização ou traqueobronquite benigna até a ocorrência de broncopneumonia necrosante ou fibrosante grave.

Segundo Murray et al. (2000) a infecção pulmonar em pacientes com FC tem sido associada à exacerbação da doença subjacente, bem como a doença invasiva no parênquima pulmonar. As cepas mucóides estão comumente associadas nestes pacientes, e sua erradicação é difícil com antibioticoterapia.

Portanto, a *P. aeruginosa* é resistente a maioria dos antibióticos, sendo dominante e importante quando a flora normal é suprimida pela susceptibilidade antimicrobiana (Brooks et al., 2004).

Para Murray et al. (2000), pelas características específicas da *P. aeruginosa*, é surpreendente como não seja considerada como o patógeno mais comum, e sim como basicamente oportunistas (i.e, restrita a pacientes com comprometimento das defesas do hospedeiro).

Isto ilustra a importância da capacidade do hospedeiro de impedir a colonização e invasão por pseudomonas.

Abaixo, na Figura 7, podemos visualizar os principais fatores de virulência da *P. aeruginosa*.

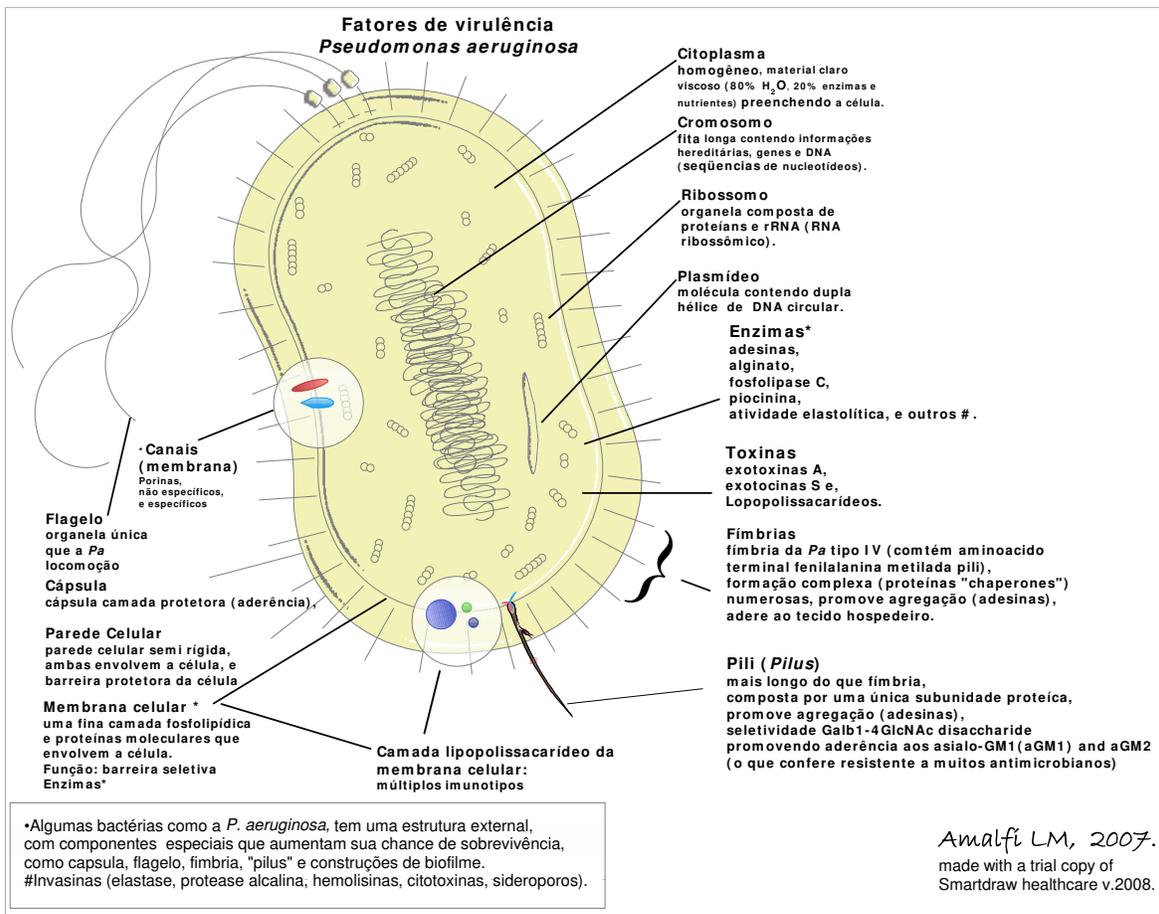


Figura 7- Diagrama baseado no modelo proposto por Brooks et al., 2004. Toda estrutura antigênica da *P. aeruginosa* é importante fator de virulência. Figura central meramente ilustrativa de uma bactéria *P.a.*. O **Flagelo** neste gênero de pseudomonas é único, e no caso da *Burkholderia cepacia*, outro gênero importante na FC, são três. *Pa*=*Pseudomonas aeruginosa*

1.4.2.3- Transmissão e vias de aquisição

As pseudomonas são microrganismos ubíquos encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. Encontrados também em todo o ambiente hospitalar em reservatórios úmidos, como alimentos, flores cortadas, pias, sanitários, esfregões para piso, equipamento de tratamento respiratório, diálise, e até mesmo soluções desinfetantes e assoalhos de hospital. São capazes de tolerar uma ampla faixa de temperatura (4 a 32°C) (Aaron et al., 2002, 2004).

A persistência do estado de portador nos seres humanos é rara como parte da flora microbiana normal, a não ser que o indivíduo esteja hospitalizado, ou seja, um hospedeiro imunocomprometido ambulatorial (Murray et al., 2000).

A ampla distribuição ambiental das pseudomonas é assegurada por suas exigências simples para o crescimento. Muitos compostos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono de nitrogênio, e algumas cepas podem até mesmo crescer em água destilada, utilizando diminutas quantidades de nutrientes (Murray et al., 2000).

Grupo de alto risco: fibrose cística com tratamento anterior com antibióticos de amplo espectro, comprometimento respiratório, hospitalização prolongada, infecção cruzada (paciente-a-paciente) e comprometimento da função imunológica (Barth e Pitt, 1996, 1998, 1999; Robinson, 2003).

1.4.3- Morfotipo mucóide

Uma das características clinicamente mais importantes da infecção por *P. aeruginosa* é a tendência dessa bactéria de mudar para um morfotipo colonial mucóide, provavelmente iniciando um estágio crônico-infectante da doença (Lyczak et al., 2002).

O morfotipo mucóide resulta da produção bacteriana em grande escala de polissacarídeos que cercam a célula. Esse material foi designado como “mucoid exopolysacaride” ou MEP (exopolissacarídeo mucóide) (Mims et al., 2005).

O material a que se referem os estudos é um polímero composto por ácido D-manurônico acetilado e ácido Lglucurônico e é comumente chamado alginato. Estudos com técnicas imunoquímicas comprovam que todas as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC produzem MEP, até mesmo aquelas classificadas como não mucóides. (Gilligan, 1991).

Este polissacarídeo faz um grande papel na evasão bacteriana da resposta imune do hospedeiro (Lyczak et al., 2002).

Um dos estudos teóricos sugere que a maior função do alginato pode ser a formação de microcolônias em biofilme (Govan e Deretic, 1996, Aaron et al., 2002), que é um aspecto da patogênese da infecção pulmonar crônica em FC.

A habilidade de *P. aeruginosa* crescer como um biofilme aumenta a resistência bacteriana frente à fagocitose e aos antibióticos (Lyczak et al., 2002, Aaron et al., 2002).

As cepas mucóides de *P. aeruginosa* podem frequentemente não produzir pigmento. Para estas cepas, o achado de colônias mucóides, não fermentadoras da glicose e constituídas de bacilos Gram-negativos pode complementar a identificação preliminar (Kiska e Gilligan, 2003).

Novos estudos sugerem a utilização de vacina em recém-nascidos, diagnosticados através da triagem neonatal, antes do início da infecção por *P. aeruginosa* mucóide, para retardar a aquisição destes microrganismos (West et al., 2002).

No estudo de West et al. (2002) foram observados pacientes diagnosticados pela triagem neonatal, com infecções por *P. aeruginosa* mucóide que ocorreram de 6 a 12 meses antes do organismo isolado nas secreções pulmonares.

Observou-se, através de monitoramentos longitudinais com vacina de anticorpo de *P. aeruginosa*, a melhora no tratamento de infecção por *P. aeruginosa* mucóide em crianças com FC.

1.4.3.1- Patogenia e imunidade

Os isolados de *P. aeruginosa* produzem numerosos fatores de virulência, incluindo exotoxina A, exoenzima S, elastase, protease alcalina, pioverdina, dois tipos de hemolisinas, lipopolissacarídeos, *Pili* e MEP (Gilligan, 1991).

A aderência da *P. aeruginosa* ao epitélio respiratório e/ou à mucosa respiratória parece ser a principal responsável pelo papel no processo inicial de colonização. O epitélio, prejudicado por infecção viral ou colonização prévia por outra bactéria, predispõe a fixação da bactéria ao tecido. Acredita-se que *P. aeruginosa* adere ao epitélio primário por meio de

Pili, mas a exoenzima S e o alginato também possuem propriedades aderentes (Ferkol et al., 2006).

P. aeruginosa na sua forma mucóide é a mais virulenta, podendo ser encontrada em pacientes com infecções graves, muitas vezes no mesmo paciente, onde já existe na sua forma não mucóide (Döring, 2000).

Novos estudos revelaram que a distinção destas formas da bactéria é importante para o modo do tratamento. Muitas vezes a forma mucóide e não mucóide podem ser originadas da mesma cepa, porém podem apresentar perfil bioquímico e de suscetibilidade a antibióticos muito diferentes. (Miller e Gilligan, 2003).

A produção do alginato em *P. aeruginosa* também é responsável por reduzir a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos pulmões e por si própria inibe a ativação do sistema complemento (Döring, 2000)

Como já mencionado, as células de *P. aeruginosa* mucóide são inerentemente resistentes à fagocitose por ambos PMN e macrófagos, comparando-se com cepas não mucóide. Tal situação pode ser exacerbada pela ligação da bactéria aos fatores do hospedeiro como mucinas respiratórias ou pelo crescimento em forma de biofilme (Lyczak, et al., 2002).

Alguns pacientes com FC podem sobreviver até a idade adulta sem se tornarem cronicamente colonizados ou infectados com *P. aeruginosa* mucóide (Barth e Pitt, 1996, 1998).

Estudos demonstraram que estes pacientes possuem anticorpos opsonofagocíticos específicos para o MEP. Os pacientes colonizados também possuem esse tipo de anticorpo, mas não são específicos para MEP. Essas informações sugerem que, se uma resposta imune pudesse ser montada especificamente para o MEP, os pacientes com FC poderiam ser protegidos da infecção por *P. aeruginosa*. Essa observação teve implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas contra este morfotipo (Gilligan, 1991, Govan e Deretic, 1996).

A principal hipótese para a falha da resposta imune é que esta se constitui de anticorpos específicos para o MEP que falham na mediação da opsonização (Lyczak et al., 2002).

1.4.3.2- Transmissão e vias de aquisição

Os pacientes de FC podem adquirir a bactéria através de uma variedade de fontes ambientais até mesmo de piscinas para hidroterapia e, apesar da infecção cruzada ser a maior preocupação entre os pacientes de FC, o grau de segregação de *P. aeruginosa* em pacientes não infectados e infectados varia de acordo com o centro de tratamento (Gaspareto et al., 2007).

A recente habilidade de identificar pela tipagem do DNA a transmissão de patógenos, particularmente *P. aeruginosa* mucóide entre pacientes com FC, tem levado a um maior cuidado na prática clínica em vários centros de tratamento, principalmente em sessões de fisioterapia. Isso deve envolver todos os grupos de pacientes respiratórios (Robinson et al., 2003).

A transmissão paciente-a-paciente geralmente resulta de um contato prolongado entre eles. Foi documentado por vários pesquisadores que os pacientes com FC podem inclusive carregar a mesma cepa de *P. aeruginosa* (Saiman e Siegel, 2004).

1.4.4- Complexo *Burkholderia cepacia*

A *Burkholderia cepacia* foi primeiramente descrito como um patógeno significativo entre os pacientes com FC, em meados dos anos 80. Estudos subsequentes mostraram que *B. cepacia* inclui pelo menos nove variantes genômicas ou espécies genômicas, todas referentes ao complexo *B. cepacia*, conforme o Quadro 1.

São bacilos Gram-negativos aeróbios estritos, anteriormente denominados de *Pseudomonas*, que apresentam resistência às polimixinas (Trabulsi e Alterthum, 2005).

As bactérias deste gênero têm sido isoladas em inúmeras fontes de água e superfície úmida, incluindo soluções detergentes como a clorohexidina, bem como fluidos intravenosos e anestésicos. É uma das únicas bactérias não fermentadora que são lisina descarboxilase positiva, juntamente com *S. maltophilia* (Trabulsi e Alterthum, 2005).

A utilização de um meio seletivo para o isolamento primário desses microrganismos é muito importante para não descartar totalmente a presença de *B. cepacia* no escarro do paciente com FC (Saiman e Siegel 2001, 2004; Silva Filho, 2002; Barth, 2005).

Segundo Coenye (2007), o erro de identificação como complexo *B. cepacia* pode ter um importante impacto médico, social e psicológico.

As infecções das vias respiratórias em pessoas com FC são caracterizadas por exacerbações intercorrentes e agudas, com febre, perda de peso, tosse aumentada, alteração do volume, cor e aparência do escarro, taxa respiratória aumentada e surgimento de infiltrações nas radiografias de peito. Tipicamente, períodos de relativo bem estar são seguidos por episódios destas exacerbações pulmonares, que resultam em uma progressiva deterioração da função pulmonar (Coenye, 2007).

Em 1984 a crescente prevalência da infecção por *B. cepacia* entre pacientes recebendo cuidados no centro de FC de Toronto (Canadá) e a ocorrência de uma deterioração de rápida progressão na função respiratória de alguns pacientes foi descrita.

Esta assim chamada ‘síndrome cepacia’ é caracterizada por pneumonia e sepsia, e foi observada em 20% dos pacientes infectados. Aumentos similares da infecção do trato respiratório pela *B. cepacia* foram subsequentemente percebidos em outros centros de tratamento da FC na América do Norte e na Europa (Coenye, 2007).

Os pacientes de FC parecer ser especialmente propensos a infecções por este organismo. Ainda assim, comparada à *B. cepacia*, a prevalência da infecção por *B. gladioli* na população CF é bastante reduzida (Coenye, 2007).

Ainda segundo o autor, ocasionalmente, outras espécies de *Burkholderia* também podem ser encontradas em pacientes de FC. Elas incluem a *Burkholderia pseudomallei* (o agente causador da doença tropical melioidose) e a *Burkholderia fungorum* (uma bactéria do solo ocasionalmente também encontrada em amostras clínicas humanas).

A fibrose cística representa, nos países desenvolvidos, a principal indicação de transplante pulmonar, dada a maior prevalência da doença entre os anglo-saxões (Camargo, 2002).

Alguns critérios de exclusão de potenciais candidatos não são consensuais, como, por exemplo, a colonização por *Burkholderia cepacia*, que alguns serviços consideram um elemento de alto risco, a ponto de descartar a indicação de transplante, enquanto outros centros, igualmente experientes, não conseguem demonstrar nenhuma diferença significativa na evolução em função da presença desse colonizante. Uma situação idêntica se observa em relação à colonização por *Aspergillus* (Camargo, 2002).

Quadro 1- Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* e distribuição de espécies entre os isolados de complexo *B. cepacia* encontrados em pessoas com FC nos Estados Unidos, Canada e Itália (em %).

VARIANTE GENÔMICA	DESIGNAÇÃO ESPÉCIE	EUA	CA	ITA
I	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.6	0.2	4.1
II	<i>Burkholderia multivorans</i>	37.8	9.3	5.4
III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	50.0	80.0	86.5
IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	0.2	3.8	4.1
V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	5.1	1.6	-
VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	2.0	-	-
VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	0.7	-	-
VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	-	-	-
XIX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	-	-	-
OUTRAS		1.6	1.8	-

FONTE: Miller e Gilligan, (2003); Coenye³, (2007).

EUA: Estados Unidos da América, CA: Califórnia, ITA: Itália.

(-) Não informado.

³http://www.cfww.org/pub/edition_3/Portuguese/New_and_Emerging_Respiratory_Tract_Infections_Portuguese.html 2007.

1.4.4.1- Epidemiologia e impacto clínico

O primeiro caso de colonização pulmonar por *B. cepacia* em pacientes com FC apareceu nos anos 70 (Govan e Deretic, 1996).

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento da incidência de colonização por esta bactéria em pacientes com FC e surtos têm ocorrido em alguns centros (Henry, 1997).

A colonização pulmonar por *B. cepacia* em pacientes com FC é geralmente refratária ao tratamento antibiótico, levando aproximadamente 30% desses pacientes a uma rápida evolução clínica fatal no período de um ano da aquisição desses microrganismos (Campbell, 1995; Chen, 2001).

Muitos pacientes sucumbiam pela síndrome de *B. cepacia* que se caracterizava por pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da média de sedimentação de eritrócitos e leucocitose, que culminavam em uma rápida e fatal deterioração clínica (Govan e Deretic, 1996).

A epidemiologia de *B. cepacia* em FC parece ser diferente do padrão aceitável para *P. aeruginosa*. Pacientes com espécies posteriores são geralmente colonizados por cepas únicas. Há evidências da existência de uma cepa epidêmica de *B. cepacia* em alguns centros de FC (Barth e Pitt, 1998).

O rápido crescimento de *P. aeruginosa*, nos meios de cultura, pode dificultar o isolamento de outros microrganismos, incluindo *B. cepacia*, que contribuem para o progresso da doença pulmonar em pacientes com FC (Gilligan et al., 2006).

Eventualmente, o isolamento de *B. cepacia* no escarro de pacientes colonizados por longo tempo não tem sido efetivo, causando controvérsias na padronização do tratamento dos pacientes. Daí a necessidade da utilização de um meio de cultura seletivo para isolamento destes microrganismos (Campbell, 1995; Cunha, 2004; Barth, 2005).

As técnicas de diagnóstico molecular também são importantes para diferenciar *Burkholderia cepacia* (Barth, 2005) e de *Burkholderia gladioli*, um microrganismos difícil de diferenciar e recentemente implicado em infecções respiratórias graves em pacientes com FC (Campbell, 1995; Silva Filho 2005).

1.4.4.2- Patogenia e imunidade

As cepas de *B. cepacia* produzem uma variedade de fatores de virulência que incluem lipase, protease e hemolisinas, mas não está claro como esses fatores estão relacionados com a patogênese da bactéria na FC (Barth e Pitt, 1998).

Embora os fatores que permitem a colonização pulmonar sejam pouco entendidos, as proteínas de membrana externa associada aos *Pili* na superfície da bactéria têm um papel importante na adesão de *B. cepacia* ao trato respiratório

Essa bactéria é capaz de invadir o epitélio aéreo e pode também causar bacteremia disseminada. É intrinsecamente resistente a vários antibióticos pela presença de porinas, e a existência de anticorpos específicos antiporinas está correlacionada a um bom prognóstico (Lyczak et al., 2002).

Essa resistência está relacionada também à permeabilidade seletiva da parede celular, alteração da célula-alvo e à inativação enzimática de antibióticos (Miller e Gilligan, 2003; Gilligan et al., 2006).

1.4.4.3- Transmissão e vias de aquisição

Bactérias do complexo *B. cepacia* são encontradas no solo e nas plantas. Espécies diferentes do complexo aparentemente ocupam vários nichos no ambiente natural, mas são necessários mais estudos para esclarecer esse ponto. O risco da presença dessas cepas no ambiente natural permanece incerto (Saiman e Siegel, 2004).

Acredita-se que a infecção por *B. cepacia* dissemina-se por contato direto paciente-a-paciente, por transmissão nosocomial ou por aquisição a partir do meio ambiente (Chen, 2001), ou seja, é transmissível tanto dentro como fora do ambiente hospitalar (Lyczak et al., 2002).

Infecções por *B. pseudomallei* em pacientes de FC parecem ser em sua maior parte associadas a viagens, uma vez que as infecções por este organismo são normalmente associadas a viagens ao sudeste da Ásia, uma área onde a *B. pseudomallei* é frequentemente encontrada (Coenye, 2007).

1.4.5- *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes 'Achromobacter' xylosoxidans*

Stenotrophomonas maltophilia é um bacilo Gram-negativo aeróbio estrito de vida livre, única espécie do gênero *Stenotrophomonas* denominada anteriormente de *Pseudomonas maltophilia* e *Xantomonas maltophilia* (Trabulsi e Alterthum, 2005).

Tem emergido como importante patógeno oportunista adquirido em hospital, e é o terceiro bacilo não fermentador mais freqüentemente encontrado em laboratório clínico (Trabulsi e Alterthum, 2005).

É resistente à maioria dos antibióticos usados comumente contra pseudomonas (aminoglicosídeos e β -lactâmicos), e é susceptível ao cloranfenicol. Tem sido isoladas em secreções colhidas no escarro (Coenye, 2007).

Segundo o autor, este organismo foi isolado pela primeira vez em pacientes de FC no meio dos anos 70, e sua prevalência vem crescendo desde então. Há grandes diferenças regionais na prevalência deste organismo, com a prevalência na América do Norte (1.8 –10.3%) sendo menor que aquela percebida na maior parte dos países europeus (até 25%).

A duração do período de hospitalização, ventilação mecânica, uso de nebulizadores e a quantidade de antibióticos recebida parecem ser importantes fatores de risco para a aquisição de *S. maltophilia* (Coenye, 2007).

Apresentam-se móveis, hidrolisam a esculina e caracterizam-se pela reação de oxidação de glicose fraca e fortemente positiva de OF maltose e OF lactose.

O *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* estão sendo encontrados com maior freqüência na FC, principalmente na população adulta. O papel de qualquer desses microrganismos na doença pulmonar, porém, não foi ainda determinado (Miller e Gilligan, 2003).

1.4.5.1- Epidemiologia e impacto clínico

Ambas as bactérias podem ser patógenos emergentes em pacientes com FC, por isso é crítico estabelecer a transmissibilidade desses microrganismos. A prevalência desses microrganismos tem sido frequentemente relatada, porém com diferenças entre os entros de tratamento de pacientes com FC (Trabulsi e Alterthum).

A patogenicidade de *S. maltophilia* e *Alcaligenes xylosoxidans* em FC não foi ainda estabelecida, embora a associação destes microrganismos com as exacerbações pulmonares já tenha sido relatada (Saiman e Siegel, 2004).

Em alguns casos, os médicos estão interessados em saber se estes microrganismos estão presentes para erradicá-los através de terapia antibiótica. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos devem ser realizados pelo CIM ou MIC (concentração inibitória mínima) porque várias falhas no método de disco-difusão já foram relatadas, considerando que estes microrganismos são normalmente resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos (Miller e Gilligan, 2003).

1.4.5.2- Transmissão

Estudos epidemiológicos foram realizados para observar a transmissibilidade desses patógenos potencialmente transmissíveis. Concluiu-se que a transmissão de *S. maltophilia* pode ocorrer principalmente entre pacientes com FC através do meio ambiente, dos centros de tratamento e, até mesmo nos lares de pacientes colonizados e não colonizados foram identificadas fontes de transmissão. Para *Alcaligenes xylosoxidans* a fonte de transmissão ainda não foi identificada, mas os pacientes avaliados tinham sido hospitalizados ao mesmo tempo (Saiman e Siegel, 2004).

1.4.6- *Haemophilus influenzae* e *parainfluenzae*

Os microrganismos do gênero *Haemophilus* são pequenos bacilos Gram-negativos, algumas vezes pleomórficos, pertencentes a família Pasteurellaceae, e o *Haemophilus influenzae* é a espécie mais comumente associada a doenças (Murray et al., 2004).

A maioria das espécies de *Haemophilus* (da palavra grega que significa “amigo do sangue”) requer meios de cultivo suplementados com os fatores de crescimento (1) hematina (fator X) e NAD (fator V) (Murray et al., 2004).

Podem ser capsulados ou não, e pode ser também dividido em oito (8) biótipos com base no comportamento das amostras em uma série de testes bioquímicos, e é responsável por muitas infecções invasivas e não invasivas, inclusive a meningite (Trabulsi e Alterthum, 2005).

O *Haemophilus influenzae* não-capsulado e *parainfluenzae*, colonizam as vias aéreas de praticamente todos os indivíduos nos primeiros meses de vida. Ao contrário, o *H. influenzae* sorotipo b, são mais raros.

O *Haemophilus* é a terceira bactéria mais isolada do trato respiratório de pacientes com FC e normalmente pode não ser recuperada em pacientes adultos (Miller e Gilligan, 2003). Essa bactéria é primariamente, mas não exclusivamente, encontrada em crianças com FC (Gilligan, 1991).

1.4.6.1- Epidemiologia e impacto clínico

H. influenzae não é persistente por longos períodos nos pulmões. Embora sua colonização tenha sido relacionada com exacerbações pulmonares, não há evidência de que possa ter ocorrido uma infecção primária com declínio pulmonar relacionada a FC (Gilligan, 1991).

A epidemiologia da doença por *Haemophilus* mudou drasticamente. Antes da introdução da vacina conjugada contra o *H. influenzae* tipo b, existia uma estimativa anual de 20.000 casos de doença invasiva por esse microrganismo em crianças com idade inferior a 5 anos.

Portanto, desde a introdução das vacinas conjugadas, em dezembro de 1987, a incidência da doença sistêmica em crianças diminuiu em 95% (Murray et al., 2005).

O isolamento dessa espécie das secreções de pacientes com FC é desafiador, especialmente em pacientes co-infectados com *P. aeruginosa*.

Três estratégias podem ser propostas para o isolamento do *H. influenzae*: a utilização de AC suplementado com bacitracina, incubação das placas anaerobicamente para diminuir o crescimento de *P. aeruginosa* ou o uso de técnica de cultura quantitativa. (Miller e Gilligan, 2003).

Os fatores de virulência incluem cápsulas, LPS (LOS – lipooligossacarídeo), peptidoglicano, fimbrias, proteínas de membrana, e até o momento não foram detectadas produção de toxinas por esta espécie (Trabulsi e Alterthum, 2005).

1.4.6.2- Transmissão vias de aquisição

Muitas vezes, *H. influenzae* começa colonizando, primariamente, o trato respiratório superior. Dados relacionados ao potencial patogênico dessa bactéria, virtualmente não existem, mesmo assim muitos clínicos consideram a possibilidade desses microrganismos colonizarem os pulmões, de maneira significativa o bastante para justificar a terapia (Lyczak, et al., 2002).

1.4.7- *Klebsiella pneumoniae*

Os membros do gênero *Klebsiella* pertencente da grande família Enterobacteriaceae, também conhecida como bacilo de Frielander (Trabulsi e Alterthum, 2005).

Faz parte da microbiota comensal normal, podendo causar infecções oportunistas, principalmente aos pacientes com FC (Murray et al., 2004d), também pode ser encontrada nas fezes de crianças, e depois do uso de antibióticos a frequência é mais elevada (Trabulsi e Alterthum, 2005).

A *Klebsiella pneumoniae* reage de maneira cruzada com *Streptococcus pneumoniae* (microrganismo muito isolado em CRD de pacientes com FC), e são fermentadoras de lactose (teste para diferenciar a espécie no gênero) (Murray et al., 2004).

A ausência de atividade citocromo oxidase constitui em uma característica importante, uma vez que esta atividade pode ser determinada rapidamente por um teste simples e é utilizada para distinguir a família.

A *K. pneumoniae* é a única do gênero que possui uma cápsula proeminente, que é responsável pela aparência mucóide das colônias isoladas e pela virulência aumentados dos microrganismos *in vivo* (Murray et al., 2004).

Segundo os autores, os pacientes com FC apresentam maior risco de desenvolver pneumonia devido à sua incapacidade de remover secreções orais aspiradas das vias aéreas inferiores.

A pneumonia devida à espécie da *K. pneumoniae* freqüentemente envolve a destruição necrótica dos espaços alveolares, a formação de cavidades (fibrose) e a produção de escarro sanguinolento (Murray et al., 2004; Trabulsi e Alterthum, 2005).

1.4.8- Fungos

O principal microrganismo fúngico responsável pela infecção pulmonar em pacientes com FC é *Aspergillus spp.* Os fungos filamentosos são freqüentemente recuperados de amostras respiratórias de pacientes com FC, especialmente com o aumento do uso de ágar seletivo para *B. cepacia* que auxilia no crescimento de fungos. O *Aspergillus fumigatus* tem sido reconhecido como associado aos sintomas pulmonares em pacientes com FC (Miller e Gilligan, 2003).

1.4.8.1- Epidemiologia e Impacto clínico

Por ser o fungo ubíquo na natureza, casos de aspergilose, nas mais variadas formas clínicas, têm sido descrito em todo o mundo. Casos de aspergilose associados a FC, devem ser bem mais freqüentes. Em alguns centros do Brasil, tem surgido trabalhos importantes chamando atenção para o problema de fungos associados a FC.

Especificamente estes microrganismos causam aspergilose broncopulmonar alérgico (ABA) em pacientes com FC. A aspergilose e o aspergiloma invasivo não são comuns nessa população. Esse microrganismo também aparece em exacerbações pulmonares e geralmente o prognóstico é ruim (Gilligan, 1991).

O diagnóstico dessa entidade é baseado mais no critério clínico do que na recuperação do microrganismo (Miller e Gilligan, 2003).

1.4.8.2- Transmissão

Infecções por *Aspergillus fumigatus* são adquiridas por exposição ambiental e não podem ser totalmente prevenidas. Altas concentrações de esporos podem se tornar aerossóis durante construções ou em jardinagem, ao cortar grama. Vazamentos de água também pode ser fonte de *Aspergillus spp.* no ambiente. Cuidados corretos devem ser tomados com a exposição de pacientes vulneráveis, principalmente pacientes com FC que realizaram transplantes de órgãos sólidos. (Saiman e Siegel, 2004).

1.4.9- Micobactérias e vírus

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos, e uma vez corados, não podem ser descorados com soluções ácidas, daí a denominação bacilos ácido-resistentes.

As micobactérias são ainda uma causa de mortalidade e morbidade, particularmente em países com recursos médicos limitados, como em alguns estados do Brasil (Brasil, 2003).

As micobactérias não *tuberculosis* são os microrganismo do gênero que tem sido relacionado à FC, e é considerada como microrganismo emergente e oportunista, mas é necessário que avancem estudos microbiológicos na inter-relação entre o microrganismo e a FC (Trabulsi e Alterthum, 2005).

O papel das micobactérias na doença pulmonar crônica, ainda não foi bem estabelecido. As micobactérias atípicas são as mais encontradas. Como a expectativa de vida dos pacientes com FC tem aumentado a colonização por micobactérias atípicas pode se tornar proeminente e, em alguns casos, poderá causar deterioração pulmonar (Gilligan, 1991).

Com relação aos vírus e micobactérias não tuberculosas, autores como Ester et al. (2005) e van Ewijk et al. (2005), recomendam para pacientes com sinais e sintomas refratários, mesmo bebês, que amostras respiratórias devem ser inoculadas também para estes microrganismos.

Novos estudos são necessários para elucidar as micobactérias relacionada à doença FC, portanto não foram incluídos estes microrganismos em nosso estudo.

1.5- Tratamento

Apesar dos avanços no conhecimento da doença, ainda não existe tratamento específico para a FC. Devido ao seu caráter multissistêmico e crônico, o tratamento deve ser realizado em centros de referência com equipe multidisciplinar. Deve-se estabelecer um programa de tratamento contínuo, visando à profilaxia das infecções e das complicações. Deve ser iniciado logo que possível, e ser individualizado levando-se em conta a gravidade e os órgãos acometidos. O tratamento precoce retarda a progressão das lesões pulmonares, melhora o prognóstico e aumenta a sobrevida (Ribeiro JD et al., 2002).

Segundo os autores, os principais objetivos do tratamento da FC são:

- A educação continuada do paciente e dos familiares em relação à doença;
- a profilaxia das infecções com um programa de vacinação completa;
- a detecção precoce e o controle da infecção pulmonar;

- a fisioterapia respiratória e melhora da obstrução brônquica;
- a correção da insuficiência pancreática através da administração de enzimas;
- o apoio nutricional, com orientações em relação à dieta e suplementação de vitaminas;
- o monitoramento da progressão da doença;
- o monitoramento de complicações;
- o aconselhamento genético familiar;
- o apoio psicológico para o paciente e seus familiares;
- o acesso irrestrito às medicações;
- e, manter os pacientes e familiares informados sobre os avanços nos conhecimentos da FC (preservando uma atitude otimista em relação à doença).

1.5.1- Antibioticoterapia

Os antimicrobianos ou antibióticos são substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética com capacidade de inibir ou matar microrganismos. (Rossi e Andreazzi, 2005)

O tratamento com antibióticos é, provavelmente, o fator mais importante responsável pela melhora dos pacientes com FC, tanto em termos de sobrevida como em qualidade de vida. Os antibióticos são muito efetivos na redução da infecção das vias aéreas, preservando a saúde pulmonar (Orenstein, 1996).

Segundo Döring (2000) a antibioticoterapia pode ser realizada através: antibioticoterapia de demanda (quando o uso de antibióticos ocorre somente quando houver sinais de exacerbações agudas da doença pulmonar); como antibioticoterapia profilática (uso de antibióticos antes que *P. aeruginosa* seja detectada); para prevenir colonização e infecção; como antibioticoterapia de manutenção e; quando há uso de antibióticos por tempo prolongado (contínua ou intermitentemente).

Os antimicrobianos são agrupados em classes, de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação. A estrutura molecular define os mecanismos de ação. Dois grandes grupos podem ser divididos em beta-bactâmicos e não-beta-lactâmicos (Rossi e Andreazzi, 2005).

Segundo Manrique e Galvão, a estrutura química (derivados de aminoácidos, derivados de açúcares, derivados de acetatos e propionatos e outro), tipos de microrganismos sobre os quais atuam ou ainda, efeito provocado no microrganismo.

Para o estudo epidemiológico da FC, o consenso Europeu preconiza a maioria dos pacientes com FC sucumbem às infecções crônicas respiratórias, de patógenos oportunistas como a *P. aeruginosa*. Portanto o fator determinante para a escolha do antibiótico, a dosagem e a duração do tratamento, e o estudo de novos antimicrobianos, devem seguir o contexto da infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*, pelo fato da importância clínica e epidemiologia nessa patologia (Döring et al., 2000).

Os mecanismos de ação antimicrobiana versus *P. aeruginosa*, inserido no contexto foram descritos, considerando: a interferência na síntese da parede celular; as alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática; a interferência da replicação do cromossomo e; a interferência na síntese protéica (Ferreira, 2005).

Um importante grupo de antimicrobianos que agem interferindo na síntese da parede celular é o grupo dos β -lactâmicos, que constituem uma família de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidiona denominado anel β -lactâmico. Este grupamento é o responsável pela atividade antimicrobiana deste grupo de antibióticos e seu rompimento em qualquer ponto resulta na perda completa da ação antibiótica da droga (Livermore, 1995).

Ao grupo dos β -lactâmicos pertencem duas das mais importantes classes de antibióticos: as penicilinas (que podem ser naturais ou sintéticas) e as cefalosporinas. O desenvolvimento da química e da farmacologia permitiu a descoberta de novos β -lactâmicos que vêm sendo descritos, entre os quais se destacam as Cefamicinas e Carbapenêmicos (Hancock, 1998).

Pode-se definir resistência bacteriana como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estas estão sendo submetidas. No caso da resistência intrínseca, o microrganismo possui naturalmente uma determinada estrutura que lhe confere resistência aquele antimicrobiano (Livermore, 1995).

Segundo o autor, até a década de 1960, dentre os antimicrobianos existentes, a *P. aeruginosa* só se mostrava sensível à ação das polimixinas, sendo reconhecida por sua resistência natural às diferentes classes de antimicrobianos disponíveis. Posteriormente, com a descoberta de novas substâncias antimicrobianas, verificou-se a sensibilidade desta bactéria a alguns Aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e metilmicina), as carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira geração, sobretudo a ceftazidima, as cefalosporinas de quarta geração, aos Carbapenêmicos, ao aztreonam e as Fluoroquinolonas, especialmente a ciprofloxacina.

No entanto, a facilidade deste microrganismo em adquirir resistência, por fenômeno de mutação, conjugação, transposição e indução, tornou a ação dos antimicrobianos obsoleta, como no caso da carbenicilina, ou imprevisível, como no caso da ceftazidima ou da gentamicina.

A existência de genes de resistência intrínseca habitualmente confere pequena permeabilidade da parede celular à penetração das drogas antimicrobianas. Somadas a isso a aquisição de novos genes de resistência, p. ex., determina a produção de β -lactamases inativadoras de antibióticos β -lactâmicos através da hidrólise do anel heterocíclico; determina também a produção de enzimas inativadoras de Aminoglicosídeos e a produção de um mecanismo de efluxo que retira as drogas do meio intracelular como ocorre com as quinolonas (Hancock, 1998).

A emergência de resistência aos agentes antimicrobianos, detectada logo após a introdução de cada um deles, esta relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso indiscriminado desses medicamentos e a fatores relacionados às bactérias (Friedrich et al., 1999).

Entre os vários β -lactâmicos, os Carbapenêmicos principalmente o imipeném e o meropeném apresentam largo espectro de atividade bactericida (Livermore, 1992) e são estáveis à hidrólise pela ação da maioria das β -lactamases, produzidas por estes organismos, incluindo β -lactamases de espectro estendido, as ESBL (Jacoby e Medeiros, 1991; Yan et al., 2001).

Estes antimicrobianos atravessam rapidamente a membrana externa bacteriana por apresentarem alta afinidade por proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) em bactérias Gram-negativas, o Imipeném apresentando afinidade por PBPs do tipo 2 e o meropeném por PBPs do tipo 3 (Cornaglia et al., 1995).

Apesar destas características, o número de isolados clínicos Carbapenêmicos-resistente, pertencentes à família Pseudomonadaceae vêm crescendo (Watanabe et al., 1991; Marumo et al., 1995).

A resistência aos Carbapenêmicos é normalmente observada em baixos níveis (CMI, 8 a 32 μ g/mL), nesses casos a resistência ao imipeném ocorre em consequência da baixa expressão de porinas OprD, sendo este mecanismo dependente da expressão continuada da β -lactamase AMPc cromossomal.

A resistência ao meropeném e não ao imipeném pode aumentar através da alta expressão do sistema de efluxo MexA-MexB-OprM (Poole et al., 1993; Livermore, 1995).

A β -lactamase do tipo AMPc, é produzida por todas as cepas de *P. aeruginosa* e é codificada por genes cromossômicos, e sua expressão é induzida (Livermore, 1992). Agentes como benzilpenicilinas, ampicilina e a maioria das cefalosporinas de 1ª geração são fortes indutores da produção desta enzima, sofrendo rapidamente a hidrólise por sua ação.

A hidrólise de β -lactâmicos constitui um mecanismo adicional de resistência aos antimicrobianos, que aumenta seus efeitos na resistência à ação dos sistemas de efluxo (Poole, 1995) e da baixa permeabilidade celular (Livermore, 1992).

A disseminação de *P. aeruginosa*, resistente aos Carbapenêmicos, tem sido confirmada em vários locais, como: Japão, Itália, Cingapura, Inglaterra, Portugal, Grécia, Taiwan e França (Yan et al., 2001). No Brasil, foram isoladas as primeiras cepas no Hospital Universitário do Rio de Janeiro, havendo registros também na região nordeste, na cidade de João Pessoa e em São Paulo (Pellegrino et al., 2004; Santos et al., 2002).

1.6- Estudos de susceptibilidade antimicrobiana

O laboratório de Microbiologia Clínica tem por finalidade básica fornecer informações sobre a presença ou ausência de microrganismos que possam estar relacionados a processos infecciosos e a doença FC, e realizar testes de sensibilidade dos microrganismos, isoladas das amostras (CRD), para orientar a terapêutica antimicrobiana segundo padrões analíticos referendados (Rossi e Andreazzi, 2005).

Segundo as autoras, a precisa identificação do agente causal nos processos infecciosos tem se tornado, cada vez mais, um importante fator para determinar terapêuticas individualizadas e ações epidemiológicas mais amplas.

A importância para se indicar o teste de sensibilidade, avalia não só o padrão de resposta da bactéria, diante de concentrações preestabelecidas de antibióticos, correlacionadas com níveis séricos atingidos após doses usuais em pacientes em condições de normalidade (Gilligan et al., 2006).

Segundo os autores, o antibiograma reflete, basicamente, duas variáveis: a droga e a bactéria, sem considerar outros aspectos importantes como (idade, local de infecção, aspectos específicos da FC); assim seu resultado precisa ser interpretado pelo médico especialista nessa doença.

O Brasil não possui, até o momento, normas definidas para nossa realidade. A maioria dos laboratórios, como o do HC/Unicamp, adota o NCCLS – “National Committee for Clinical Laboratory Standards”. Este comitê preconiza padronizações multidisciplinares que anualmente publica recomendações e atualizações de técnicas analíticas (Rossi e Andreazzi, 2005)

1.7- A informática nas pesquisas científicas

Autores de pesquisa, com uso de dados eletrônicos, analisaram e discutiram a inserção nos hospitais e ambulatorios médicos assistenciais e/ou de ensino, os prontuários clínicos e laboratoriais de pacientes. (Wechsler et al., 2006).

Foi analisado o impacto do uso e experiência prática de um ambulatório de ensino em Pediatria, com a introdução das ferramentas de informática para a pesquisa científica (Wechsler et al., 2006).

1.7.1- Registro eletrônico do paciente (REP)

O registro eletrônico do paciente (REP), também conhecido como prontuário eletrônico do paciente (PEP), fonte de informações clínicas e laboratoriais são atualmente as ferramenta mais importantes em pesquisas científicas

Segundo os estudos de Wechsler et al. (2006) e Costa (2001) o prontuário do paciente, criado inicialmente para documentar as informações da saúde e da doença do paciente, tornou-se mais complexo, passando a ter um papel extremamente importante na sociedade moderna:

- Como subsídio de manutenção da saúde do paciente;
- No compartilhamento de informações entre diferentes profissionais;
- Como base legal para as ações médicas;
- Como fonte de pesquisa clínica, de estudos epidemiológicos, de avaliação a qualidade do cuidado e de vigilância a reações adversas de drogas;
- Como fonte de educação e reciclagem médica continuada;
- Para a identificação de grupos de pacientes específicos.

1.7.1.1- Sigilo ético de pesquisa com arquivos eletrônicos

As sociedades normatizadoras e reguladoras das atividades dos profissionais da saúde, como o Conselho Federal de Medicina e o CREMESP, entre outras, recomendam a integridade das questões éticas e legais do Registro Eletrônico do Paciente. O CREMESP,

em seu Manual de Princípios Éticos para Sites de Medicina e Saúde, recomenda: "da mesma forma que os prontuários em papel, os prontuários eletrônicos, que armazenam dados sobre os pacientes em clínicas, hospitais e laboratórios de análises clínicas devem estar protegidos contra eventuais quebras de sigilo" (Wechsler et al., 2006).

Neste contexto nossas perguntas do estudo:

- Qual o perfil microbiológico dos pacientes do HC/Unicamp, e as cepas que apresentam maior resistência aos antimicrobianos freqüentemente utilizados no tratamento de FC?
- Quais os antimicrobianos que apresentam maior eficiência terapêutica, e qual aplicabilidade do REP em pesquisa científica envolvendo uma grande base de dados, ao longo de 10 anos?

2- OBJETIVOS

○ **Objetivo geral**

- Descrever a prevalência dos principais microrganismos encontrados nas secreções respiratórias (escarro e “swabs” faríngeos) em pacientes do ambulatório de fibrose cística do HC/Unicamp, de acordo com a susceptibilidade antimicrobiana e importância epidemiológica.

○ **Objetivos específicos**

- Determinar a prevalência do *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide, *Klebsiella pneumoniae*, presentes nas secreções respiratórias dos pacientes com FC.
- Determinar a prevalência dos microrganismos emergentes: *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes (Achromobacter) xylooxidans* e de fungos como *Aspergillus fumigatus*, presentes nas secreções respiratórias dos pacientes com FC.
- Analisar a evolução da frequência destes microrganismos ao longo do período e por faixa etária, por meio da base de dados REP.
- Verificar se o perfil delineado, por meio de registros eletrônicos (REP) é coerente com os dados anotados nos cadernos de microbiologia (ALM) e arquivados nos prontuários dos pacientes (PP).

3- CASUÍSTICA E MÉTODO

MÉTODOS: Estudo descritivo (retrospectivo) com análise em base de dados eletrônicos.

CASUÍSTICA: Registro eletrônico do paciente (REP).

A casuística faz parte do ambulatório de assistência e tratamento da fibrose cística do HC/Unicamp, sendo que as três bases de dados descritas abaixo (REP, ALM e PP) fazem parte da mesma casuística.

Foram resgatados do Registro Eletrônico do Paciente (REP) ou prontuário eletrônico do paciente (PEP), 38.480 registros, referentes a 975 exames de CRD's (cultura de rotina diagnóstica) de 100 pacientes, cujos resultados das culturas foram cadastrados com o código específico do ambulatório de FC (32045) no SIH.

O período dos dados coletados do REP foi do mês de fevereiro de 1997 a fevereiro de 2006, arquivados eletronicamente no REP, e que faz parte do Sistema Informatizado de Gestão Hospitalar (SIH/SH) (Mv 2000 i tecnologia ORACLE), gerenciada pelo núcleo de informática do HC/Unicamp (NIHC).

Utilizando o número de registro hospitalar (RG/HC), o código definido no SH para os resultados das CRD's, e o código específico do ambulatório de FC, foi possível resgatar as informações sobre o perfil microbiológico dos pacientes com diagnóstico definido de FC, que passaram pelo atendimento especializado, e que realizaram pelo menos um exame CRD que tenha sido arquivado eletronicamente.

Um banco de dados foi formatado no Núcleo de Informática do HC/Unicamp (NIHC), de acordo com as variáveis pertinentes ao estudo. As variáveis foram copiadas da linguagem ORACLE e transportada para o formato de Acess (Microsoft Office v.2003).

3.1- REP - critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes com diagnóstico confirmado de FC (dois testes de suor anormais e/ou estudo genético com mutações identificadas nos dois alelos) e analisados a prevalência dos microrganismos frequentemente relacionados na literatura especializada, com a doença respiratória da FC: *Pseudomonas aeruginosa* dos morfotipos

mucóide e não mucóide, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia*, *Aspergillus fumigatus* e *Alcaligenes (Acromobacter) xylooxidans*.

3.1.1- Variáveis

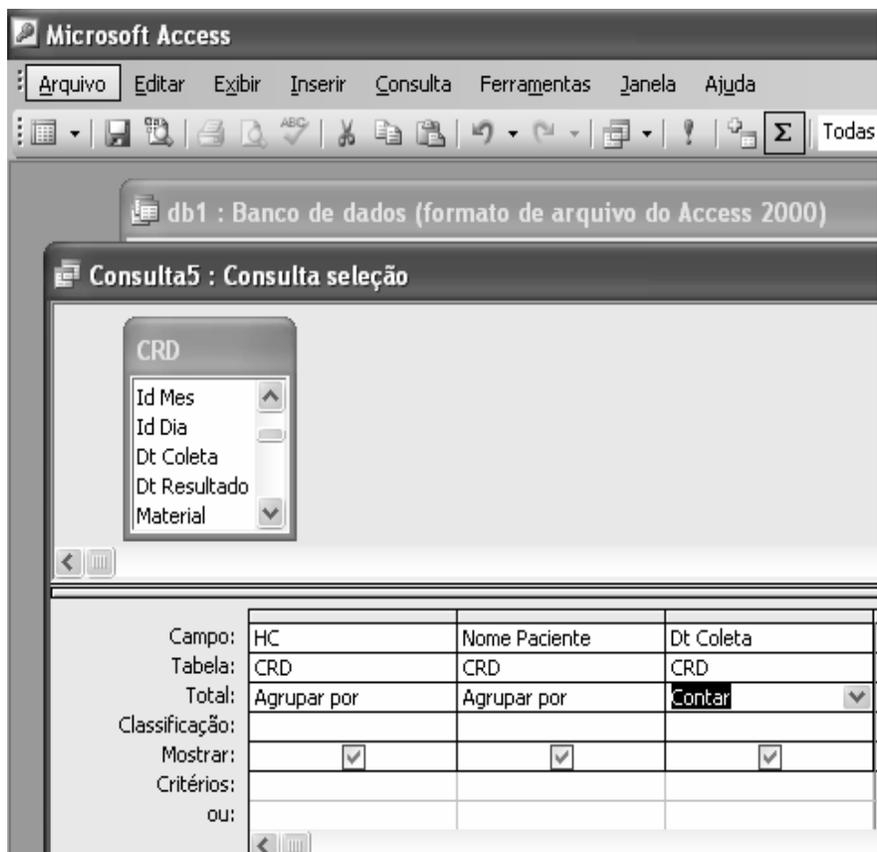
O banco de dados no Access (Microsoft Office, v.2007), resume uma grande quantidade de dados rapidamente, ou os combina com tabelas diferentes. Foi possível girar suas linhas e colunas para ver resumos diferentes dos dados de origem, foi utilizada a ferramenta filtro, os dados exibindo páginas diferentes ou exibir os detalhes das áreas de interesse. O banco de dados Access foi utilizado como ferramenta filtro para as variáveis escolhidas, para posterior submissão à análise estatística (Quadro 3 e 4).

Quadro 2- Tela interativa do software Access, selecionando as variáveis deste estudo

<i>Variáveis de resultados das culturas de rotina diagnóstica CRD</i>	
Paciente:	† HC (registro de atendimento no Hospital das Clínicas Unicamp), documento paciente (RG) ou do responsável, † sexo , † idade ,
Material exame	Tipo do material colhido († escarro ou † swab), † data coleta , data resultado,
Descrição resultados	† microrganismos incluídos no estudo e isolados no CRD (REP, ALM e PP)
Descrição P. Ativo	† antimicrobianos testados para os microrganismos isolados († resistência e † sensibilidade)

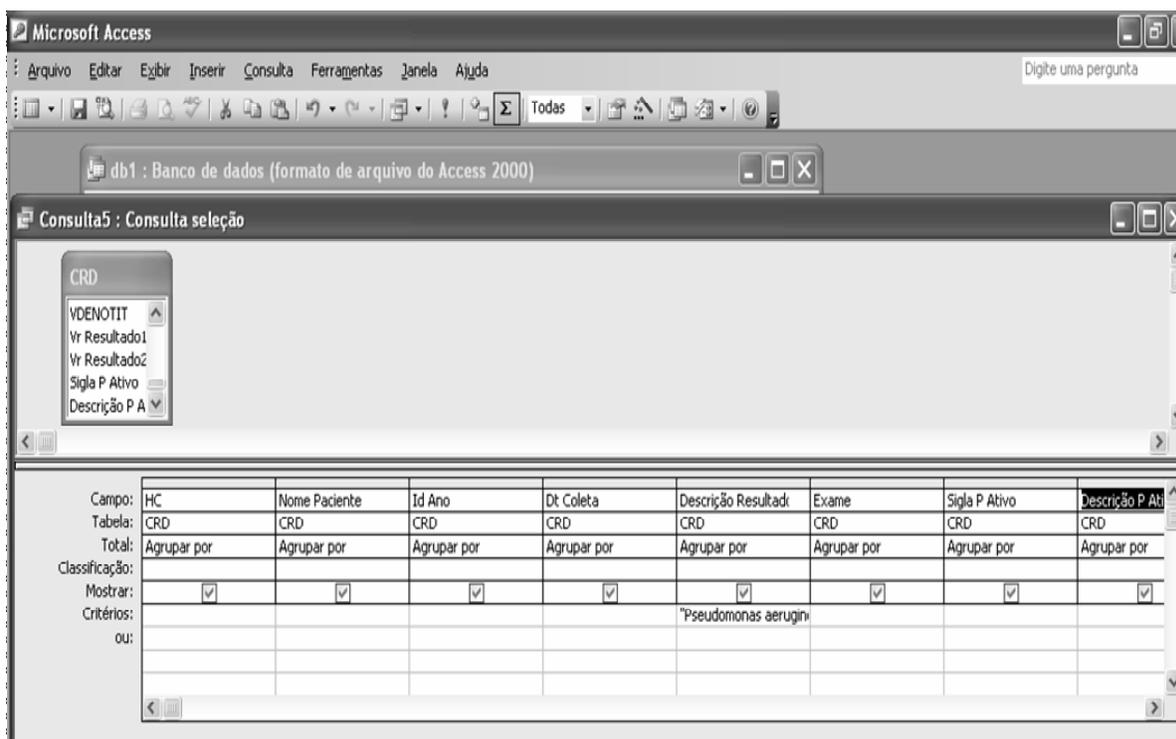
† nome variáveis selecionadas em **negrito**

Quadro 3- Ferramenta de consulta do Access, utilizando a ‘ferramenta filtro’ para selecionar as variáveis escolhidas (total de exames CRD por paciente, utilizando a variável data de coleta).



No Quadro 4, modelo do uso da ferramenta de consulta do Access, usando a ferramenta filtro para as variáveis escolhidas (total de exames CRD por paciente, utilizando a variável data de coleta como parâmetro).

Quadro 4- Exemplo da ferramenta consulta filtro, para **contar** a quantidade ‘total CRD por paciente’



Quadro 5- Tela interativa com o resultado da pesquisa do Quadro 4, apresentando a distribuição de exames CRD's realizados por paciente ao longo do período estudo (REP).

ID	Nome Paciente	ContarDeDt Coleta
162993		1
240127		1
252530		1
438324		4
589955		32
841999		1
027055		11
307700		1
447633		36
675210		4
717527		18
722556		38
896066		10
026030		24
125628		1
195372		25
195863		3
504816		1
646400		3
813261		29
908030		3
927929		36
040728		23
052713		7
199620		3
247758		4
286928		2
313210		22
529869		1

†Sigílo ético de pesquisas com arquivos eletrônicos

As sociedades normatizadoras e reguladoras das atividades dos profissionais da saúde, como o Conselho Federal de Medicina e o CREMESP, entre outras, recomendam a integridade das questões éticas e legais do Registro Eletrônico do Paciente, como determinado no projeto desse estudo, segundo descrito nas normas para o sigilo em pesquisas com seres humanos (considerações éticas aprovados CEP FCM/Unicamp Anexo 1)

3.1.2- Vantagens e limites encontrados no resgate das variáveis do REP

- **Vantagens:**

São numerosas as vantagens de um prontuário eletrônico em relação ao baseado em papel, que vão desde questões ligadas ao melhor acesso, até maior segurança e, principalmente, oferta de novos recursos, os quais são impossíveis de existir no prontuário em papel, tais como:

- Apoio à decisão.
- Uso da ferramenta ‘filtro’ para selecionar rapidamente somente as variáveis do estudo.
- Troca eletrônica dos dados entre instituições, etc.

É importante destacar que, ao contrário do que se imagina, o REP é muito mais seguro e tem maior possibilidade de manter a confidencialidade do que os prontuários em papel, no qual o risco de um acesso não autorizado ocorrer é maior que num sistema. Este estudo foi autorizado pelo Diretor Clínico do HC/Unicamp e aprovado pelo CEP FCM (Anexo 1).

- **Limites:**

- Falta de entendimento das capacidades e benefícios do REP: é de suma importância que todos os usuários do sistema, bem como a diretoria da instituição, estejam cientes de todos os recursos que o REP pode oferecer, bem como todos os benefícios que ele pode proporcionar.
- Padronização: a falta de padronização nos sistemas de REP provocou a perda ou inviabilizou muito dos recursos que poderiam ser oferecidos, tais como: falta de digitação de alguns dos microrganismos deste estudo, múltiplos códigos de Acesso ao ambulatório especializado (pacientes do ambulatório de FC foram indevidamente cadastrados em outras especialidades como pneumopediatria, gastropediatria, pediatria geral), impossibilitando o Acesso a todos pacientes e os devidos resultados de seus exames CRD.
- Interface com o usuário: para que os dados sejam armazenados de forma estruturada, que é um dos requisitos necessários para o REP, inclusive para a própria codificação, é necessário que a entrada dos dados seja feita de forma estruturada e rigorosamente correta. Não se pode realizá-la na forma de texto livre, o que causa certo "desconforto" para os profissionais de saúde acostumados ao método tradicional em papel. Não pode haver erros de digitação na transcrição de resultados, causa de ‘viés’ na pesquisa.

- Conteúdo do REP: ainda não há um consenso sobre o conteúdo que um banco de dados, para laboratório de Microbiologia Hospitalar, deveria possuir. No Brasil, o responsável pelo serviço é o comitê Padronização do Registro Clínico (DATASUS, 2001).

OBS.: Novos dados foram coletados (descritos abaixo), nos arquivos do laboratório de microbiologia (ALM) e nos prontuários dos pacientes (PP), para avaliar se o perfil delineado através dos dados do REP é coerente aos laudos (resultado original) arquivados nos prontuários dos pacientes (PP) e anotados nos cadernos de microbiologia (cinco cadernos com anotações detalhadas de profissionais do laboratório).

3.2- Arquivos do Laboratório de Microbiologia (ALM)

Foram resgatados os resultados referentes aos exames CRD's, de anotações realizadas no laboratório de microbiologia (especialmente para os pacientes FC), durante o período de um(1) ano (fevereiro de 2001 a fevereiro de 2002), no total de cinco(5) cadernos recolhidos do sótão dos laboratórios. Para a coleta de dados, formatou-se uma planilha no Excel (Apêndice 1 e 2), e a planilha tabulada foram transportadas também para o Acess da Microsoft (v.2007). Os dados tabulados foram organizados e selecionados pela ferramenta 'filtro' do modo de consulta do banco de dados Acess (v.2007) e salvos nas duas versões para amenizar conflitos da linguagem do Office da Microsoft, instalado em diversos setores da Unicamp.

Em seguida os dados foram abertos no SPSS 15 (SPSS for Windows, Rel. 11.0.1. 2007. Chicago: SPSS Inc., *Evaluation* version). Os critérios de inclusão e variáveis seguiram os mesmos critérios para o REP, acrescentando as variáveis para o estudo de susceptibilidade antimicrobiana (*Staphylococcus aureus* versus Oxacilina) e (*Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide para os antibióticos da classe dos Aminoglicosídeos: Gentamicina, Amicacina, e outros como: Ciprofloxacina, Imipenem e Ceftazidima (códigos para coleta de dados no Apêndice 1).

- **Limitação:**

Como em qualquer estudo retrospectivo, encontramos dificuldades em obter estas informações, já que não há espaço suficiente para anotar e armazenar todos os resultados de exames de cada laboratório, em um hospital público. Atualmente, todas as informações e resultados são cadastrados no SH, portanto as anotações das CRD, guardados em ‘cadernos especiais’ para mucovisidose, foram encaixotados com demais laudos de cada ano (sendo o último caderno no ano de 2003), e armazenados no sótão do conjunto de laboratórios, junto com os demais arquivos de exames de todo complexo laboratorial do HC/Unicamp.

3.3- Análise de prontuários de pacientes (PP)

Foram analisados resultados de CRD registrados em prontuários de nove pacientes com FC (10% amostra do REP), que são acompanhados há mais de 10 anos em nosso centro de referência (daqueles que foi possível resgatar o histórico completo). Para a coleta de dados, formatou-se uma planilha no Excel (Apêndice 2).

Para a coleta de dados, formatou-se uma planilha no Excel (Apêndice 1 e 2), e a planilha tabulada foi transportada também para o Access da Microsoft (v.2007). Os dados foram organizados e selecionados pela ferramenta ‘filtro’ do modo de consulta do banco de dados Access (v.2007) e salvos nas duas versões para amenizar conflitos da linguagem do Office da Microsoft, instalado em diversos setores da Unicamp.

Em seguida os dados foram abertos no SSPS 15 (SPSS for Windows, Rel. 11.0.1. 2007. Chicago: SPSS Inc., *Evaluation* version).

Os critérios de inclusão e variáveis foram os mesmos para o REP e ALM, acrescentando as variáveis para o estudo de susceptibilidade antimicrobiana (*Staphylococcus aureus* versus Oxacilina) e *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide para os antibióticos da classe dos Aminoglicosídeos: Gentamicina, Amicacina, e outras classes mais utilizadas na FC como: Ciprofloxacina, Imipenem e Ceftazidima (Apêndice 1 e 2).

- **Limitação:**

Como em qualquer estudo retrospectivo, encontramos problemas para obter os dados como: agendar no SAME com antecedência, e, pela quantidade de pastas de pacientes com FC com mais de 10(dez) anos de acompanhamento, foi necessário um período de espera para a busca das pastas em outras cidades e setores. Outros limites encontrados: desvio de pastas (2ª via: causa de viés, criando uma lacuna entre os dados perdidos), falta de laudos de CRD's apenas anotados nas planilhas de consultas, dificuldade de manuseio, tempo para vasculhar cada pasta.

3.4- Metodologia Estatística

3.4.1- REP

Para descrever o perfil da amostra, segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (faixa etária, microrganismos) os valores de frequência absoluta (n) e percentual (%).

Para analisar a associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste exato de Fisher (presença de valores esperados menores que cinco).

Para analisar o efeito de tendência ou evolução do microrganismo ao longo dos anos e por faixa etária foi utilizada a Análise de Regressão Linear, e feito o cálculo do coeficiente de correlação de *Pearson*. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$

Esta análise foi realizada no setor estatística da FCM/Unicamp. Os programas utilizados pelo setor de estatística FCM/Unicamp foram o SAS for Windows (v.7.0) e Microcal ORIGIN. 3.0 para os gráficos.

Toda metodologia estatística realizada pelo setor de estatística da FCM/Unicamp, foi descrita nos relatórios Anexo 2.

3.4.2- ALM

Foram utilizados os mesmos cálculos estatísticos das análises descritivas e variáveis categóricas para traçar o perfil microbiológico nesta base de dado.

Para o estudo de susceptibilidade antimicrobiana (estudo de resistência e sensibilidade dos antibióticos freqüentemente utilizados *versus* microrganismos isolados), utilizamos a Análise descritiva para as variáveis categóricas (microrganismo *versus* antimicrobianos incluídos no estudo), e para cruzar os dados foi utilizada a ferramenta “crosstable” for SPSS 15 (SPSS for Windows, Rel. 11.0.1. 2007. Chicago: SPSS Inc., *Evaluation* version). e Epi Info.

As estatísticas nessa base de dado foram realizadas pelo autor, e conferidas pelo estatístico da FCM/Unicamp.

3.4.3- PP

Como para as variáveis do ALM, foram utilizados os mesmos cálculos estatísticos das análises descritivas e para as variáveis categóricas, traçando o perfil microbiológico também desta base de dado.

Para o estudo de susceptibilidade antimicrobiana (estudo de resistência e sensibilidade dos antibióticos freqüentemente utilizados *versus* microrganismos isolados), utilizamos a análise descritiva para as variáveis categóricas (microrganismo *versus* antimicrobianos incluídos no estudo), e para cruzar os dados foi utilizada a ferramenta “crosstable” for SPSS 15 e Epi Info.

Análises realizadas pelo autor, posteriormente conferidas pelo estatístico da FCM/Unicamp.

3.5- Amostra laboratorial

Os dados obtidos dos registros eletrônicos, referentes aos resultados do exame de CRD dos pacientes com FC, foram processados pelo laboratório de microbiologia do HC/Unicamp.

De uma maneira geral, são solicitados dois tipos de exames ao laboratório de microbiologia: pesquisa e cultura. A pesquisa de microrganismos é realizada através de microscopia e deve ser realizada a partir do material a fresco. As técnicas microscópicas são variadas e permitem a avaliação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A cultura permite o isolamento dos microrganismos infecciosos e sua posterior identificação. Abaixo, a descrição de CRD padronizado pelo laboratório de microbiologia para o SH “on-line”, para descrever a rotina do laboratório de microbiologia do HC/Unicamp.

3.5.1- Cultura de Rotina Diagnóstica (CRD)⁴

- Comentário e Interpretação: Avaliar e identificar a presença de bactérias em diversos espécimes clínicos.
- Material e Coleta: Qualquer espécime clínico, como escarro por tosse espontânea, ou *swab* tosse induzida. Imprescindível indicar o material ou o sítio de coleta.
- Condições do Paciente: Coletar antes de medicação antibiótica ou suspender, se possível, por três dias.
- Interferentes: Antibióticos.
- Método: Bacterioscopia, após coloração pelo método de Gram. e cultura em meios apropriados, conforme o material a ser analisado.

3.5.1.1- Pesquisa de germes multirresistentes⁴

- Comentário e Interpretação: Diagnóstico de colonização de pacientes ou seus contatos.
- Material e Coleta: Secreção de orofaringe, nasofaringe, traqueal feita através de *swab* estéril.
- Condições do paciente: Sem preparação prévia.

⁴<http://www.hc.Unicamp.br/labpatologia.shtml>

- Interferentes: Nenhum.
- Método: Cultura em meios seletivos para isolamento de: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e outros.
- Valor de referência: Cultura negativa.

3.5.1.2- Coleta⁴

As amostras foram devidamente identificadas com o nome, idade e número de registro do paciente, origem (enfermaria, ambulatório), especialidade, tipo de material coletado, nome do médico, data e hora da coleta. O rótulo, com a identificação, foi colocado no frasco de coleta e não na tampa.

Em pacientes adolescentes, as amostras foram coletadas em frasco estéril de boca larga, com volume de cerca de 3 a 5 ml. As amostras de escarro foram obtidas por esforço de tosse, com ou sem nebulização, utilizando solução de cloreto de sódio a 4,5%.

Em pacientes pediátricos e com dificuldade de expectorar, as amostras foram colhidas de orofaringe por *swab* pós-tosse induzida, ou, provocada com técnicas fisioterápicas. O *swab* é removido cuidadosamente e colocado no meio de transporte adequado.

3.5.1.3- Transporte⁴

O transporte das amostras foi feito de maneira que se mantivessem as mais próximas possíveis de seu estado original, com o mínimo de deterioração para que não houvesse riscos de contaminação durante o manuseio. As amostras foram transportadas rapidamente ao laboratório de Microbiologia do HC/Unicamp, acondicionadas em caixas de isopor. O *swab* foi removido cuidadosamente e colocado no meio de transporte adequado em frasco plástico, seco ou em meio semi-sólido, como o *Stuart* ou *Amies*.

3.5.1.4- Periodicidade das coletas

As amostras são coletadas com periodicidade de 2 a 4 meses, dependendo da frequência às consultas dos pacientes no ambulatório de FC.

3.5.1.5- Armazenamento das bactérias isoladas

As bactérias isoladas das culturas de amostras de escarro e orofaringe foram armazenadas em caldo BHI com 15% de glicerol no “freezer” a -80°C para posterior análise.

3.6- Coloração de Gram e microscopia

O exame microscópico no HC/Unicamp foi realizado de duas maneiras: a partir do material a fresco (exame direto) ou a partir de colônias isoladas. O exame direto pode ser realizado com ou sem coloração e é uma etapa fundamental no diagnóstico microbiológico, pois permite a verificação da viabilidade da amostra, visualização da presença leucócitos e de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos ou leveduras), de maneira que se possa estabelecer um diagnóstico presuntivo e imediato. Além disso, a avaliação microscópica permite determinar quais serão os meios de cultura mais adequados para a semeadura do material, de acordo com as características morfológicas e tintoriais dos microrganismos visualizados. A microscopia, a partir de colônias isoladas, foi útil como etapa preliminar da identificação dos microrganismos.

A coloração de Gram baseou-se na capacidade que algumas bactérias possuem de reter o cristal violeta no interior da célula, mesmo quando submetidas a uma solução descolorante, em virtude da natureza química de sua parede celular. As diferenças na estrutura da parede celular das bactérias dividem-nas em dois grandes grupos, de acordo com o seu comportamento frente à coloração de Gram, em bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular com cerca de 80nm de espessura, composta de várias camadas de glicopeptídeos, proteínas, polissacarídeos e ácido teicóico.

As bactérias Gram-negativas não conseguem reter o cristal violeta, em razão da espessura e composição de sua membrana celular. Sendo assim, quando submetidas à solução descolorante (álcool – acetona), sofrem descoloração e, em seguida, coram-se com a Fucsina, apresentando coloração avermelhada.

Para a realização da bacterioscopia, o conteúdo do *swab* foi diluído em uma solução salina, estéril, e homogeneizado no vórtice. A partir da suspensão obtida, foi retirada uma alíquota, com o auxílio de uma pipeta conta-gotas, para a realização do esfregaço e posterior coloração pelo método de Gram.

Com a cooperação do pessoal do laboratório de microbiologia do HC/Unicamp, foi possível descrever, através de relatórios de pesquisadoras, dados de amostras viáveis como no (Quadro 6).

Quadro 6- Amostras que requerem tratamento prévio antes da coloração de Gram

<i>AMOSTRA COLETADA COM "SWAB"</i>
O <i>swab</i> pode ser rolado sobre a lâmina, para evitar a destruição dos elementos celulares e dos grupamentos. Também poderá ser preparada uma suspensão com solução salina estéril (0,4 ml) e agitar (vórtice). Neste caso, deverá ser retirada uma alíquota com uma pipeta Pasteur estéril, para evitar a contaminação do restante do material. A mesma suspensão poderá ser utilizada para a cultura.
<i>AMOSTRA ESCARRO</i>
Com auxílio de alça bacteriológica ou um palito de madeira, deverá ser selecionada uma porção purulenta do escarro que seja representativa. Rolar esta porção na parede do frasco para separar do material salivar. Em seguida, deve-se colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa, confeccionando um esfregaço delgado.

FONTE Prof. Dr. Carlos Emilio Levy - Relatório de Procedimentos Microbiologia HC/Unicamp

3.7- Culturas

As amostras de escarro sem tratamento prévio foram submetidas ao cultivo bacteriano, inoculando, primeiramente, com alça apropriada em ágar-sangue de carneiro (AS), ágar-chocolate suplementado (AC) e ágar de MacConkey (MC) em semeadura por

esgotamento, com, no mínimo, quatro estrias. As culturas em AS e AC foram incubadas em estufa de CO₂, à temperatura de 37° C, por um período de 24 – 72 horas, as culturas em MC são incubadas em estufa de aerobiose. Após este período, foi realizada uma avaliação do crescimento, em que são avaliados os crescimentos, a partir da 1ª estria, em casos de bronquietasia e FC.

As culturas em meio de meio seletivo específico para *Burkholderia cepacia* foram utilizadas somente no ano de 2003, durante uma pesquisa realizada por Dr. Barth (2005). As placas de BCSA foram incubadas à temperatura de 32°C a 33°C por até cinco dias.

3.7.1- Pesquisa de fungos

Para a pesquisa de fungos, realizou-se a fluidificação do escarro com 1 ml de ditionitrotol a 0,1% e, após a centrifugação, foi semeada uma alíquota do sedimento desta amostra em ágar glicose de Sabouraud (SAB), e incubado à temperatura ambiente, por até 30 dias. Também foi usado, seguindo o manual “CUMITECH 43” (2006), o ágar- Mycosel que contém antibióticos para inibir o crescimento de bactérias.

3.8- Caracterização fenotípica por microrganismos

Os microrganismos foram caracterizados fenotipicamente, através de suas respectivas provas bioquímicos que são utilizadas rotineiramente no laboratório de bacteriologia do HC/Unicamp CUMITECH 43 (v.2006).

3.9- Automação microbiológica

A identificação bacteriana foi realizada com o Sistema Vitek (bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO). Testes bioquímicos adicionais para identificação bacteriana foram realizados, quando necessários.

3.10- Procedimentos para a identificação

Todos os procedimentos para a detecção e identificação são realizados seguindo as normas e técnicas preconizadas no "CUMITECH" 43 (v. 2006) e o manual de identificação de bactérias de Importância Médica ANVISA (v.2004).

3.10.1- Identificação de bacilos não fermentadores

Os bacilos Gram-negativos classificados como não fermentadores (BNFs) são microrganismos aeróbios, não esporulados, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação, degradando-os pela via oxidativa.

Quadro 7- Principais BNFs e testes aplicados

<i>BNFs de importância clínica[◊] e testes para a identificação dos BNFs*</i>	
<i>Achromobacter spp</i>	Tubo de OFglicose (com ou sem vaselina)
<i>Alcaligenes spp.</i>	Tubo com polimixina
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tubo com TSI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>mucóide e não mucóide</i>)	Tubo com caldo NaCL 6,5% Disco de oxidase Disco de PYR
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	Placa MC

FONTE: ANVISA, 2004

[◊]incluídos em nosso estudo; *bacilos não fermentadores

No Quadro 8, algumas das provas para ilustrar a complexidade e especificidade de provas microbiológicas. O laboratório de microbiologia do HC/Unicamp, seguem as normas técnicas preconizadas pelo ANVISA e CUMITECH 43, similar aos melhores centros de referencias laboratorial em outros países (Gilligan et al., 2006).

Quadro 8- Provas, sementeiras, leitura e interpretação dos BNFs:

PROVAS	SEMEADURAS	LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Disco de Oxidase	Retirar 2-3 colônias com alça. Esfregar sobre a fita ou disco teste; pode umedecer o papel com 1 gota de salina estéril.	A leitura é feita em 15 a 20 segundos. A cor violeta forte aparece rapidamente. Após este intervalo, cores violeta-pálido são falsos positivos. A <i>Burkholderia cepacia</i> pode dar reação fraca.
Tubo de OF glicose (com e sem vaselina)	Picar com agulha até o fundo do tubo.	Fermentador: dois tubos ficam amarelos (ácido) -Oxidativo: tubo sem vaselina amarelo /tubo com vaselina verde. -Inerte ou alcalino: dois tubos não mudam de cor (inerte) ou o tubo sem vaselina fica azulado (alcalino). Aguardar, no mínimo, 72 h para definir como inerte, pois pode ocorrer a oxidação tardia ou lenta.
Citrato	Semear com agulha na superfície do meio.	-A cor azul forte aparece no pico, e, com maior incubação, estende-se a todo o meio.
Caldo TSB crescimento 42°C	Semear 2 colônias no caldo.	-Ocorre turbidez no meio ou é nítido o aumento da densidade bacteriana. Ideal comparar com controle mantido a temperatura ambiente.
Caldo TSB motilidade	Semear 2 colônias no caldo.	-Agitar o tubo e com uma pipeta com ponteira estéril ou alça bacteriológica estéril. -Retirar uma gota e depositar sobre uma lâmina. -Cobrir a gota com uma laminula e levar ao microscópio. Observar com aumento de 400 vezes (ocular 10 x e objetiva 40). A presença de bactérias cruzando o campo em diferentes direções é significativa de motilidade positiva; movimentos vibratórios fracos = negativo (movimento browniano). Quando o movimento de todas as bactérias é numa mesma direção, provavelmente é o movimento do líquido entre a lâmina e a laminula. Verificar a motilidade em temperaturas de 37°C e 20°C (ambiente).
Tubo com caldo NaCl 6,5%	-Semear 2 a 3 colônias no caldo.	A presença de turbidez e mudança de cor indicam o crescimento.
Tubo com ágar-esulina	-Semear 2 a 3 colônias na superfície do meio.	-Ocorre precipitado negro intenso nas provas positivas a partir de 6 horas de incubação até 48 h. -Cor castanho-escura é prova negativa.

Disco de Polimixina	-Fazer antibiograma em Mueller Hinton. - Colocar o disco.	-Qualquer halo em torno do disco significa sensibilidade.
Disco de PYR	-Colocar o disco sobre colônias de crescimento recente ou fazer suspensão densa. -Depositar 3 a 4 gotas sobre o disco de PYR.	-Incubar durante 4 horas numa placa vazia com umidade. -Colocar o disco teste em contato com o crescimento bacteriano. -Colocá-lo sobre uma lâmina. Depositar uma gota do reagente que acompanha o teste. -A presença de cor alaranjada é prova positiva; mantendo a cor amarela é prova negativa. -Recomenda-se testar controles positivo e negativo.
Placa de Mac Conkey	-Semear com alça, 1 colônia isolada.	-Crescimento deve ocorrer entre 1 a 3 dias.
TSI	-Semear com agulha, picando até o fundo do tubo e na superfície do ágar inclinado.	-Fermentador: presença de cor amarela apenas na base ou no ápice e na base. -Com ou sem H ₂ S e gás: precipitado preto e bolhas. -Não fermentador: permanece vermelho (alcalino) no ápice e na base.

FONTE: ANVISA, 2004

Próximas etapas resumidas nos quadros Quadro 9, Quadro 10 e Quadro 11 formatados para facilitar a identificação, pelo responsável pelo laboratório de microbiologia do HC/ Unicamp.

Da colônia isolada, fez-se Gram e Oxidase, observou se a colônia é pigmentada: amarelo ou rosa.

Quadro 9- Procedimento para a identificação Gram-negativos

Bacilos Gram-negativos:				
*Fazer motilidade em caldo e OF Glicose				
OXIDASE	MOTILIDADE	OF Glicose	TABELA[∞]	OBS.
Negativo	Positivo	Oxidativo/inerte	I	*
Positivo	Positivo	Oxidativo	II	*
Positivo	Positivo	Inerte ou Alcalino	IIIa e IIIb	*

FONTE: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

[∞] Tabelas se encontram no Laboratório de Microbiologia do HC/Unicamp

Quadro 10- Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos

Bacilos Gram-negativos Oxidase negativo, motilidade positivo						
OF Glicose Oxidativo ou inerte.						
Microrganismos	ARGININA	DNASE	LISINA	POLIMIXINA*	ESCULINA	IMIPENEM*
<i>P. lutela</i> (PYR +)	positivo	negativo	negativo	Sensível	positivo	sensível
<i>Burkholderia cepacia</i> (PYR-)	negativo	negativo	80%+	Resistente	variável	variável
<i>S. Maltophilia</i> (PYR)	negativo	positivo	93%	Sensível	variável	resistente

FONTE: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy – Laboratório de Microbiologia HC/Unicamp

Quadro 11- Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos

<i>Bacilos Gram-negativos: Oxidase positivo motilidade positivo e OF Glicose oxidativo</i>						
Microrganismos	ARGININA	NaCl 6,5%	LISINA	POLIMIXINA	ESCULINA*	GELATINA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Positivo		Negativo	Sensível	negativo	82%+
<i>Alcaligenes xiloxidans</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Sensível	negativo	variável
<i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo		80%	Resistente	variável	20%+

FONTE: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy – Laboratório de Microbiologia HC/Unicamp *Provas esculina e PYR úteis apenas para diferenciar bactérias lisina e arginina negativas

Quadro 12 – Provas bioquímicas para identificação Gram-negativos

<i>Microrganismos</i>	<i>Crescimento 42°C</i>	<i>PYR*</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Positivo</i>	<i>negativo</i>
<i>Alcaligenes xiloxidans</i>	<i>Negativo</i>	<i>negativo</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Negativo</i>	<i>positivo</i>

FONTE: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy – Laboratório de Microbiologia HC/Unicamp

3.10.2- Identificação *Staphylococcus aureus*

A identificação dos estreptococos e estafilococos é baseada na morfologia que apresentam em meios líquidos. Os estafilococos, mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados.

A identificação presuntiva começa com a inoculação primária na placa de AS que deve ser incubada em 5% de tensão de CO². As colônias de estafilococos são geralmente maiores, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo, podendo apresentar hemólise ou não. Note-se que o desenvolvimento da cor amarelada no *Staphylococcus aureus* ocorre somente após incubação prolongada (72 h), à temperatura ambiente.

3.10.2.1- Prova da Catalase

Com a alça bacteriológica ou com um palito coleta-se o centro de uma colônia suspeita e esfrega-se em uma lâmina de vidro. Colocar sobre este esfregão uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas.

Quadro 13 - Provas diferenciais *Staphylococcus aureus* dos gêneros Catalase positivo

Gênero	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	tétrade
<i>Staphylococcus</i>	negativo	positivo	negativo	não	variável

Fonte: ANVISA, 2004.

Quadro 14 - Provas diferenciais *Staphylococcus* de maior importância clínica

Espécie	DNase	PYR	Novob.	Uréia	Polimixina	Outras
<i>Staphylococcus aureus</i>	positivo	negativo	sensível	variável	resistente	Pigmento amarelo

Fonte: ANVISA, 2004.

A forma mais simples de identificar o *Staphylococcus aureus* é a prova da coagulase em lâmina ou tubo.

3.10.2.2- Teste da coagulase em lamina

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) “clumping factor” na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma, causando a coagulação do mesmo.

Não se pode executar este teste a partir de um meio de cultura com grande concentração de sal como ágar de sal manitol (AM).

3.10.2.3- Teste da coagulase em tubo

Este teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático, formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina.

3.10.2.4- Outros testes:

DNASE, endonuclease e agar de sal manitol.

3.11- Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O laboratório de microbiologia clínica, no HC/Unicamp, tem um grande desafio com relação à padronização dos antibiogramas em relação à FC, e vem desenvolvendo um trabalho de excelência, fazendo-se os testes de susceptibilidade antimicrobiana, seguindo as normas técnicas do NCCLS "*National Committee for Clinical Laboratory Standards*".

O antibiograma é uma importante ferramenta na orientação da terapêutica, e a adequação de suas metodologias, bem como o conhecimento de sua interpretação, proporciona ao profissional que trata as infecções bacterianas elementos críticos na escolha do antibiótico mais adequado. Os dados locais nos permitem, também, acompanhar tendências das diferentes espécies, bem como parametrizar a evolução dessas resistências aos agentes antimicrobianos. Informações epidemiológicas qualificadas ajudam a definir planos de ação voltados à realidade local sem perda da perspectiva global.

As orientações com relação à determinação e análise de resistências bacterianas abordadas nesta dissertação, seguem as normas do laboratório de Microbiologia e de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HC/Unicamp. Métodos de difusão de disco em meio de cultura ou E-test foram utilizados para o teste de susceptibilidade segundo o CUMITECH 43 (Gilligan et al, 2006).

3.11.1- Pelo método de difusão de disco

O método de difusão de discos em meio de cultura foi realizado segundo Kirby e Bauer em 1996, e descrito pelo “*National Commite for Clinical Standards*” (NCCLS, 2003), atualmente denominado “*Clinical and Laboratory Standard Institute*” (CLSI), responsável por estabelecer os critérios e a padronização de “breakpoints” para os diferentes antimicrobianos.

Preparou-se uma suspensão bacteriana em caldo Mueller-Hinton (MH), contendo 10^6 UFC/mL. Com o auxílio de um *swab* esterilizado, realizou-se uma sementeira contínua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a obter um crescimento uniforme em toda superfície da placa de ágar-Mueller-Hinton (OXOID). Passados aproximadamente 15 minutos, os discos de antimicrobianos foram depositados sobre o meio de cultura com o auxílio de um “disc dispenser” (OXOID) e incubados a 35°C por 18-24 horas. Após este período, com o auxílio de um paquímetro, mediu-se os diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos, comparados aos valores de referência fornecidos pelo NCCLS.

Como controle da qualidade, execução e confiabilidade, cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC27953) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram testadas sob as mesmas condições de meio de cultivo e incubação.

A escolha dos antimicrobianos foi baseada em dados da literatura de acordo com a importância clínica e epidemiologia (Ribeiro AF et al., 2005)

Quadro 15- Antimicrobianos selecionados nesse estudo e suas respectivas concentrações

<i>Antibiótico</i> (código)	<i>Antibiótico</i> (código)	<i>Antibiótico</i> (código)
Oxacilina (1)§	Gentamicina 10µg (3)§	Imipenem 10µg (13)§
Ceftazidima30µg (21)§	Amicacina 30µg (19)§	Ciprofloxacina 5µg (14)§

§Vide códigos antimicrobianos Apêndice 1.

Neste perfil foram incluídos o *S. aureus* versus a Oxacilina (MRSA/MRSSA Oxa-Resistente ou Oxa-Sensíveis), e *P. aeruginosa* mucóide e não mucóide multidroga-resistente versus Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Cefalosporinas 3a. geração (Ceftazidima) e Carbapenêmicos (Imipenem).

3.11.2- Pelo método da fita de E-teste

Em caldo Muller-Hinton (MH), promoveu-se uma suspensão bacteriana contendo 106UFC/mL. Com o auxílio de um *swab* esterilizado, realizou-se uma semeadura contínua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a se obter um crescimento uniforme em toda superfície da placa de ágar-Mueller-Hinton (OXOID), onde se aplicou a fita ao centro com a face voltada para cima. Incubaram-se as placas a 35°C por 18 horas. Após o tempo de incubação, procedeu-se à leitura do valor do MIC, determinado pela tangência da elipse formada com a inibição do crescimento, visualizado na fita.

Como controle da qualidade, usaram-se as cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC27953). Realizou-se este teste com fitas contendo os antimicrobianos Polimixina B e Imipeném.

4- RESULTADOS

4.1- Dados obtidos do Registro Eletrônico do Paciente (REP)

Dos 38.480 registros resgatados do REP foram referentes a 975 resultados de CRD's, das múltiplas coletas de secreções respiratórias, relativas a 100 pacientes FC, cadastrados no REP com o código específico para Ambulatório de FC (32045), 567 (58.15%) foram de escarro obtido por coleta espontânea e 408 (41.85%) foram de "swabs" de *cavum* pós-tosse induzida. A média das CRD's resgatadas por ano foi de 98 (Tabela 1), enquanto a média de CRD's por paciente ano foi de 1,1 CRD's por paciente/ano (Tabela 2).

Tabela 1- Análise descritiva das variáveis CRD's resgatadas do REP por ano

ANO	Frequência	Porcentagem
1997	48	4.92
1998	49	5.03
1999	31	3.18
2000	125	12.82
2001	199	20.41
2002	154	15.79
2003	139	14.26
2004	142	14.56
2005	84	8.62

Tabela 2- Calculo das variáveis das CRD's por paciente ano

VARIÁV	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIAN	MÁX
CRD/	975/	9.75	9.94	1.00	5.00	40.00
Paciente	100	1,08 CRD paciente/ano				

No banco de dados formatado para o estudo observamos a baixa frequência de CRD no REP. 1 a 5 exames (51%) por paciente, seguido de 16 a 20 exames (13%) por paciente, enquanto que apenas 3% dos pacientes tiveram mais de 30 CRD's resgatadas. (Tabela 3).

Tabela 3- Análise descritiva da quantidade de exames CRD's realizados por paciente (n=100) resgatadas do REP

Nº de CRD	Qtidade	Porcentagem
1-5	51	51.00
6-10	9	9.00
11-16	10	10.00
16-20	13	13.00
21-25	10	10.00
26-30	4	4.00
>30	3	3.00

Dos 100 pacientes, 55 eram do gênero masculino e 45 femininos, sendo que a faixa de idade variou de 1 mês a 46 anos, com uma media de idade de 10 anos e dois meses e mediana de 9 anos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Análise descritiva da faixa etária dos pacientes (n=100)

IDADE	Frequência	Porcentagem
0-1	12	12.00
2-3	18	18.00
4-6	12	12.00
7-10	17	17.00
11-14	14	14.00
15-18	13	13.00
19-21	4	4.00
22-25	5	5.00
>25	5	5.00

Tabela 5- Cálculos das variáveis em relação à faixa etária dos pacientes (REP)

VARIÁV	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIAN	MÁX
IDADE	100	10.15	8.46	0.1	9.00	46.0

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* foi de 789 (80,91%) sendo de 369 (37,85%) morfotipo mucóide e 420 (43,08%) não mucóide, seguida do *Staphylococcus aureus* (50,15%), *Haemophilus. influenzae* (30,38%), complexo *Burkholderia cepacia* (3,69%), *Klebsiella pneumoniae* (2,15%), *Alcaligenes (Acromobacter) xylosoxidans* (1,23%), *Aspergillus. fumigatus* (1,44%) e *Stenotrophomonas maltophilia* em 2,95 CRD (Tabela 6), sendo que a média de isolamento dos microrganismos de maior importância clínica e epidemiológica por CRD foi de 1,8 microrganismo por exame, entre os 1747 selecionados no total.

Tabela 6- Análise descritiva dos microrganismos isolados e registrados no REP, sobre o total de CRD's (n=975)

DESCRIÇÃO DO RESULTADO	Freqüência	Percentagem
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	12	1.23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14	1.44
<i>Burkholderia cepacia</i>	36	3.69
<i>Haemophilus influenzae</i>	151	15.49
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	145	14.89
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	21	2.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	420	43.07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	389	39,90
<i>P. aeruginosa</i> mucóide e não mucóide	389	39,90
<i>Staphylococcus aureus</i>	489	50.15
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29	2,95

A figura 08 apresenta os resultados das análises de tendência ou evolução da freqüência dos principais microrganismos no período de estudo (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *B. cepacia*, *A. xylosoxidans*, *K. pneumoniae*), através da Análise de Regressão Linear e do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, visualizando os resultados através de gráficos de séries temporais ou tendência, considerando apenas os resultados do **REP**. Pelos resultados, foi observado um aumento de *P. aeruginosa* ao longo dos anos, e redução de *S. aureus*. Verificou-se redução significativa de *Haemophilus influenzae* (**p=0.020**) e *Klebsiela pneumoniae* (**p=0.016**).

A figura 09 apresenta os gráficos da distribuição de freqüência dos microrganismos nas diferentes faixas etárias.

Observou-se uma alta incidência de colonização por *Pseudomonas aeruginosa* no primeiro ano de vida (57%), e uma intersecção entre os morfotipos mucóide e não mucóide na faixa etária de 11 a 14 anos, ou seja, elevação da prevalência do morfotipo mucóide em contraposição com a diminuição prevalência do morfotipo não mucóide.

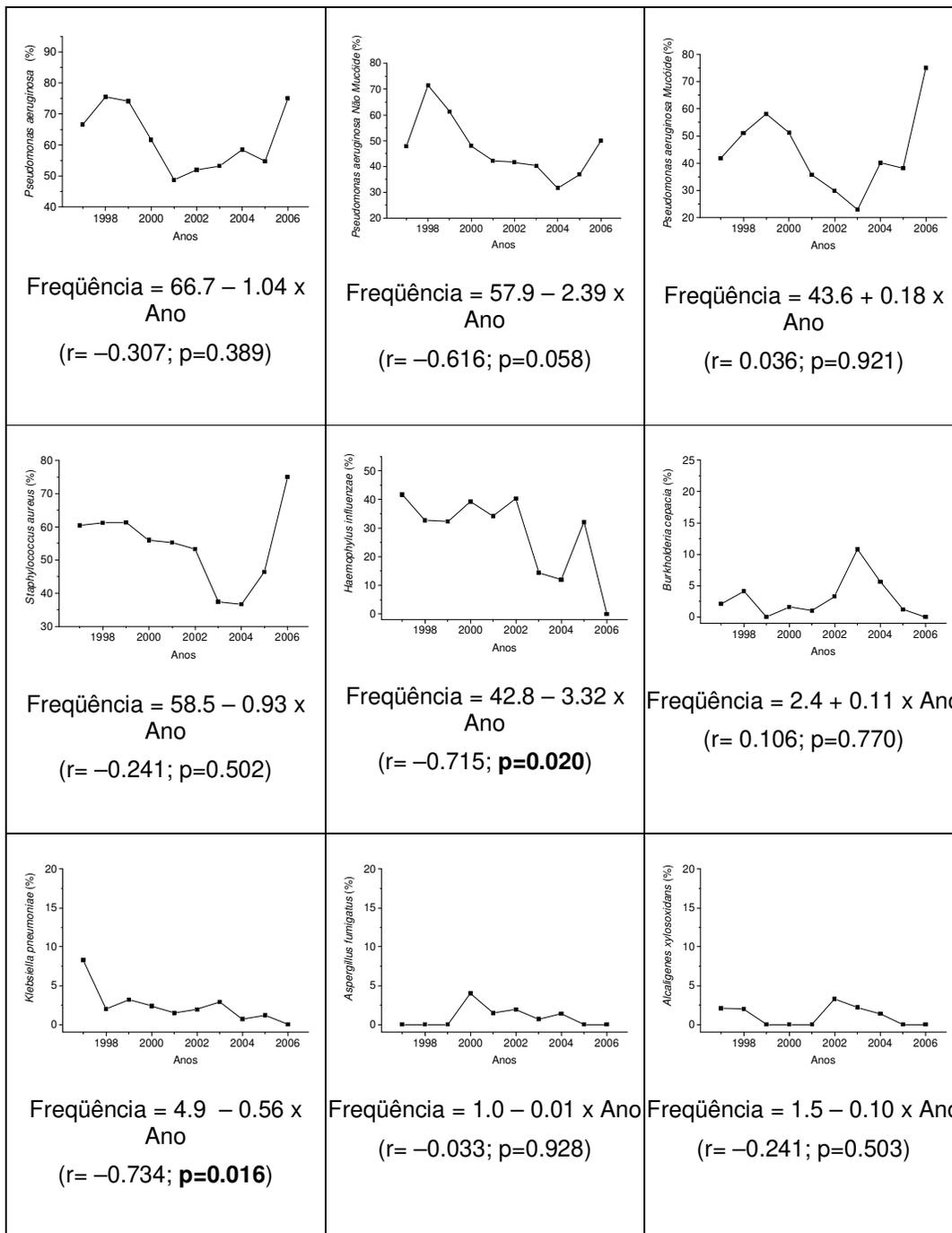


Figura 8- Evolução da frequência dos microrganismos durante o período de estudo (REP).

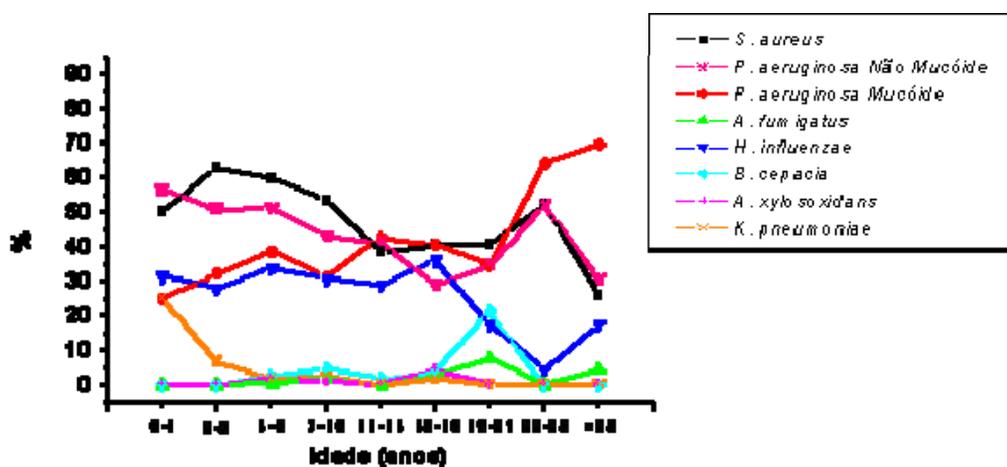
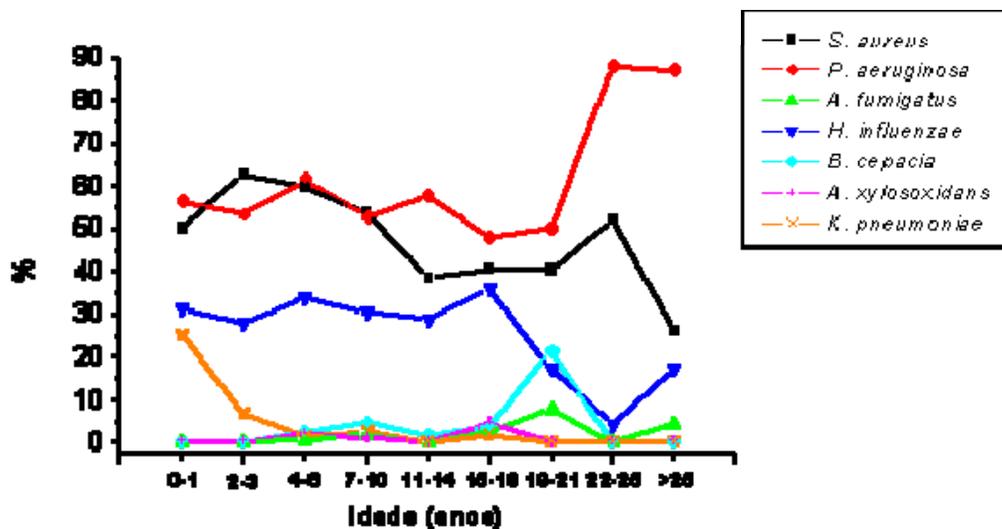


Figura 9- Evolução da frequência dos microrganismos de acordo com a faixa etária (REP).

4.2- Dados obtidos dos Arquivos do Laboratório de Microbiologia (ALM)

No período de fevereiro de 2001 a fevereiro de 2002 foram realizadas 402 CRD's relativas a 100 pacientes com diagnóstico de FC, arquivados em anotações do Laboratório de Microbiologia (5 cadernos). A média de CRD resgatada foi de 3,3 exames por paciente no ano (Tabela 7).

Tabela 7- Análise descritiva das CRD's resgatadas dos Arquivos do Laboratório de Microbiologia por paciente ano (n=402)

VARIÁV	N	MÉDIA	MÍN	MEDIAN	MÁX
CRD/ Paciente	402/ 100	4	1	5	14

Tabela 8- Análise descritiva das variáveis em relação à faixa etária dos pacientes (n=96) registrados nos ALM

VARIÁV	N	MÉDIA	MÍN	MÁX
IDADE	96	12	3	33

A prevalência dos microrganismos cadastrados nos arquivos do laboratório de microbiologia (ALM) durante um ano foi de 296 cepas em 402 amostras para a *Pseudomonas aeruginosa* (73,7%), sendo de 112 (27,8%) para o morfotipo mucóide e 184 (42,8%) não mucóide. Foram 193 isolamentos de *Staphylococcus aureus* (48%), 128 *Haemophilus influenzae* e *H. parainfluenzae* (31,84%), 4 para o complexo *Burkholderia cepacia* (1,00%), 9 *Klebsiela pneumoniae* (3,50%), 4 *Alcaligenes (Acromobacter) xylooxidans* (1,00%), 6 *Aspergillus fumigatus* (1,50%) e 8 *Stenotrophomonas maltophilia* (2,73%) (Tabela 8); sendo que a média de microrganismos (incluídos neste estudo) foram isolados em 1,9 por CRD, dos 896 microrganismos encontrados.

Tabela 9- Análise descritiva da distribuição dos microrganismos isolados e cadastrados nos arquivos ALM, calculado sobre o total de CRD's (n=402)

DESCRIÇÃO DO RESULTADO	Frequência	Porcentagem
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	4	1,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	1,50
<i>Burkholderia cepacia</i>	4	1,00
<i>Haemophilus influenzae e parainfluenzae</i>	128	31,84
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	3,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	184	45,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	112	27,86
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide e não mucóide	97	24,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	193	48,10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11	2,73

Tabela 10- Análise descritiva dos principais microrganismos resgatados dos ALM calculado sobre o total de pacientes (n=100)

DESCRIÇÃO DO RESULTADO	Frequência	Porcentagem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68	68,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	48	48,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	71	71,00

4.3- Dados obtidos dos resultados de CRD referentes aos Prontuários de Pacientes (PP)

Foram analisados os resultados das CRD's arquivadas em prontuários de 9 pacientes com FC acompanhados há mais de 10 anos em nosso Centro, dos quais foi possível resgatar todos os seus prontuários, encontrados no serviço de arquivo médico (SAME) do HC/Unicamp. Foram resgatados dados de 371 CRD's com a média de 4,1 exames paciente/ano (Tabela 11).

Tabela 11- Análise descritiva das CRD's resgatadas dos PP's (n=9) com mais de 10 anos de acompanhamento ambulatorial, sobre o numero de exames (n=370)

VARIÁV	N	MÉDIA	MÍN	DP	MEDIAN	MÁX
CRD/	370/	41,22	25	11,35	39	58
Paciente	9	4,1	2,5	1,35	3,9	5,8

A média de idade destes pacientes foi de 16 anos, sendo que a idade mínima atual destes pacientes é de 12 anos e a máxima de 33 anos (Tabela 11).

Tabela 12- Análise descritiva das variáveis em relação à faixa etária dos pacientes relativos à CRD's resgatados PP's (n=9)

VARIÁV	N PAC	MÉDIA (idade)	DP	MEDIANA	MÍN	MÁX
IDADE	9	16	3,99	16,10	12	33

A prevalência dos microrganismos cadastrados e resgatadas nos prontuários dos pacientes (PP) com mais de 10 anos de acompanhamento pelo ambulatório de FC, são referentes a 370 CRD's sendo que o perfil dos microrganismos cadastrados nos resultados dos exames de CRD's foi de 60,64% para as *Pseudomonas aeruginosa* (isolados em 225 amostras de 370 CRD's e 191 (51,48%) para o morfotipo mucóide. Foram 205 isolamentos de *Staphylococcus aureus* (55% das culturas), 99 *Haemophilus. influenzae* (26,68%), 3 para o complexo *Burkholderia cepacia* (0,9%), 9 *Klebsiella pneumoniae* (2,8%), 4 *Alcaligenes (Acromobacter) xylooxidans* (1,25%) e 8 *Aspergillus. fumigatus* (2,5%) (Tabela 12); sendo que a média de microrganismos isolados (dos incluídos estudo) por CRD foi de 2,42 microrganismo por exame, entre os 1747 selecionados no total.

Tabela 13- Análise descritiva de microrganismos isolados, sobre o numero de exames realizados (n=370), registrados em laudos arquivados nos PP's dos pacientes com FC (n=9)

DESCRIÇÃO DO RESULTADO	Frequência	Porcentagem
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	10	2,60
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14	3,70
<i>Burkholderia cepacia</i>	13	3,50
<i>Haemophilus influenzae e parainfluenzae</i>	99	26,70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	225	60,60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	191	51,50
<i>P.aeruginosa</i> mucóide e não mucóide	133	35,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	205	55,00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	1,6

Tabela 14- Análise descritiva dos microrganismos por paciente (n=9) registrados em laudos dos CRD's arquivados nos prontuários dos pacientes (PP)

DESCRIÇÃO DO RESULTADO	Frequência (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9(9)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide	8(9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9(9)

4.4- Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados (ALM e PP)

Resultados referentes aos Quadros 16-21.

Foram encontradas 13 cepas de *P.aeruginosa* multidroga resistente aos 5 antibióticos incluídos neste estudo (3,23% das CRD's), em 3 pacientes dos 9 pacientes resgatados dos PP's (33%), sendo que os mesmos pacientes apresentaram as mesmas cepas multidroga-resistente no ALM's em 3,3 % das CRD's.

13.4% das *P.aeruginosa* foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados nos ALM.

As cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram elevada sensibilidade MSSA a Oxacilina (72,7% ALM e nos 9 pacientes do PP) em comparação aos estudos publicados (Saiman et al 1991; Smith, 2006). Apenas 3 pacientes em 100 (0,03%) do ALM apresentaram-se Oxa-Resistente (MRSA).

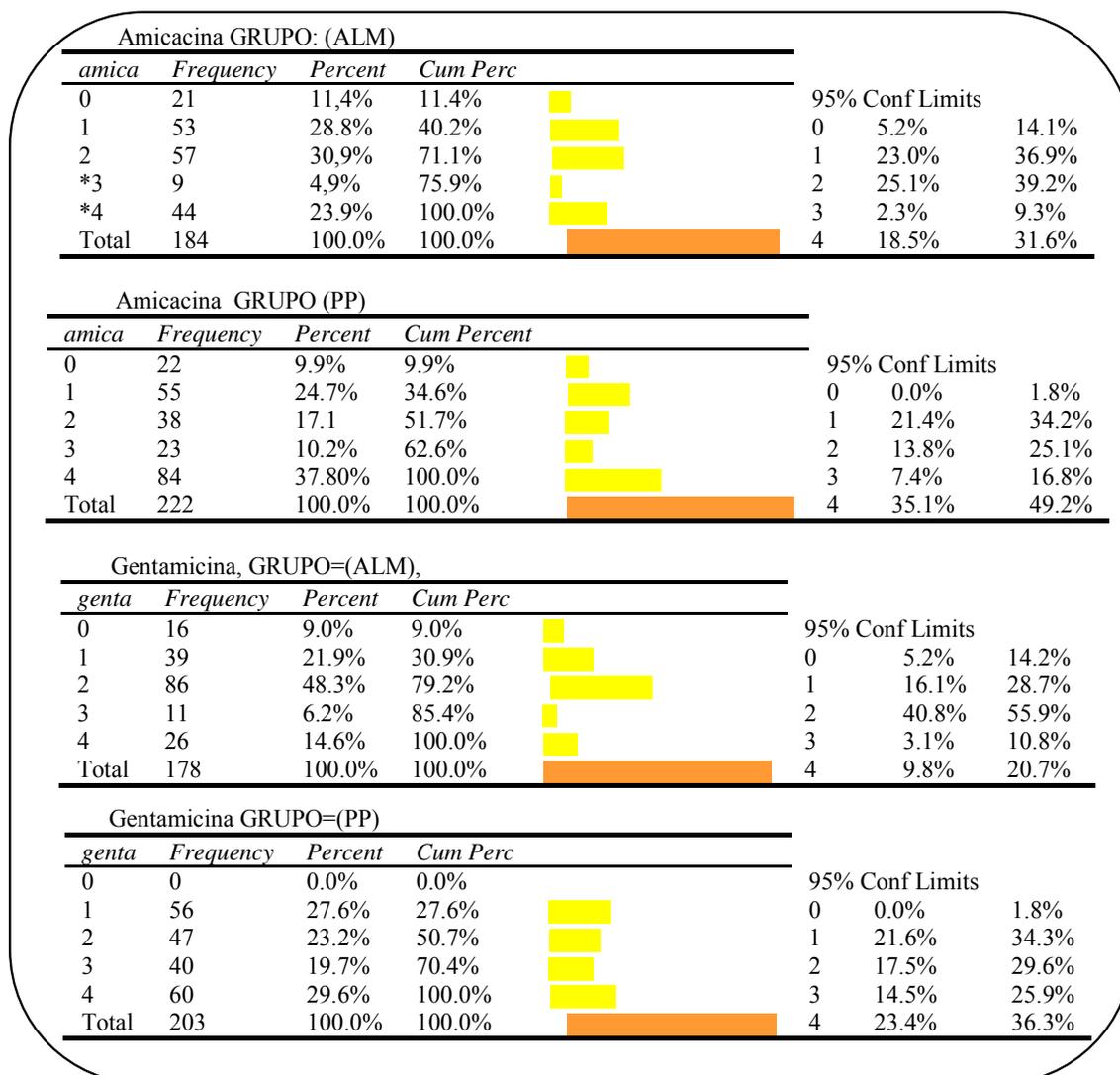
Os *Staphylococcus aureus* infectaram 60 dos 96 pacientes, sendo que 11 cepas apresentaram resistência a Oxacilina (6%).

Quanto à susceptibilidade referente à resistência antimicrobiana pelas *Pseudomonas aeruginosa*, 163 cepas foram hábeis para realizar o teste de susceptibilidade em 184 isolados em ALM e em 222 dos isolados nos PP, sendo que 57 cepas (31% ALM e 17,1% PP) desenvolveram resistência a Amicacina. Em relação à Gentamicina (46,7% ALM e 21,2% PP) das cepas *P. aeruginosa* desenvolveram resistência. Em relação aos antibióticos como Ceftazidima, Ciprofloxacina e Imipenem (16% ALM, 5% PP; 22% ALM e 7,7% PP; e 13% ALM e 8,6% PP consecutivamente) das cepas desenvolveram resistência.

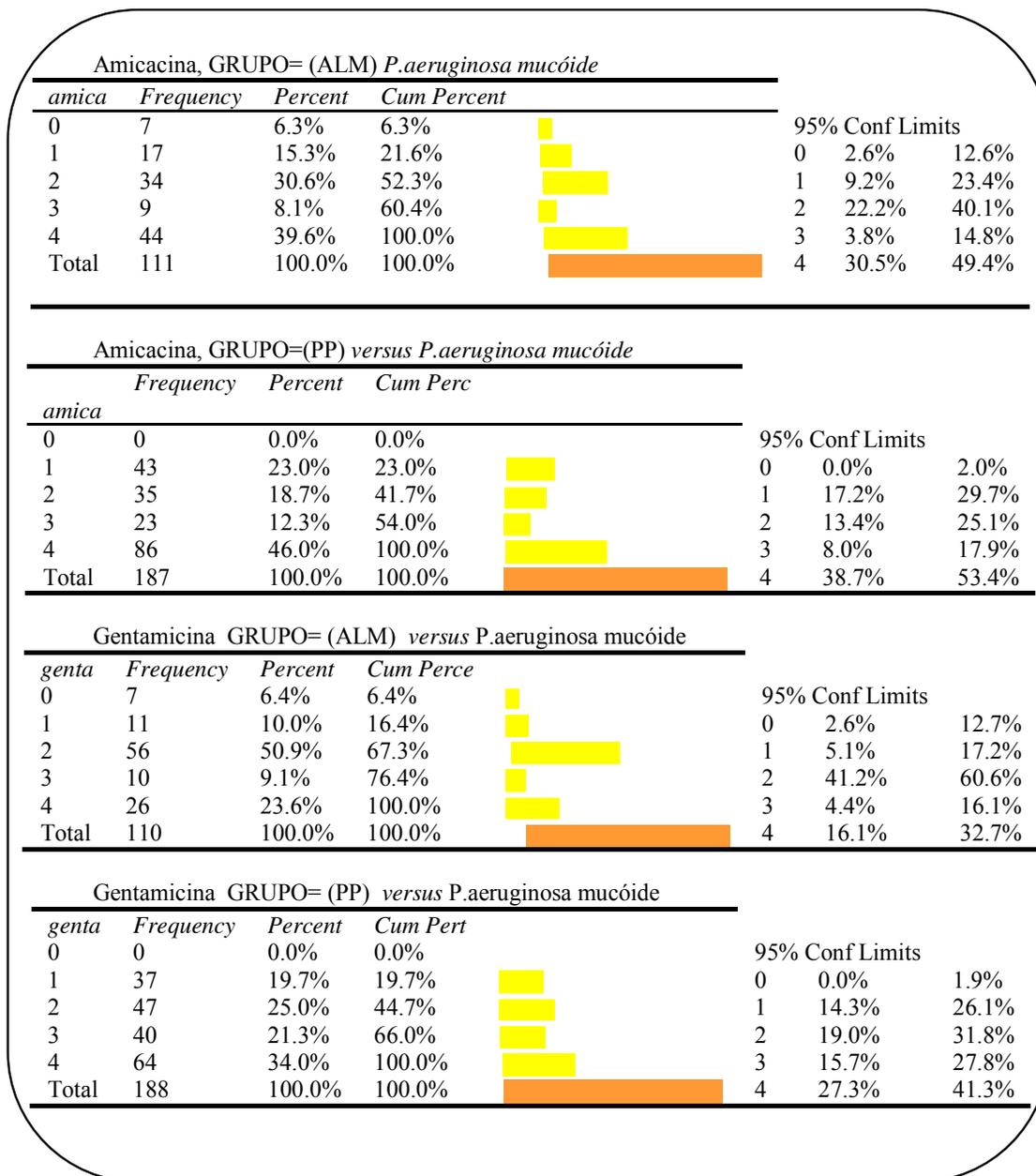
Quanto à suscetibilidade das *Pseudomonas aeruginosa* mucóide aos antimicrobianos observamos que 30,4% ALM e 18,5% PP desenvolveram resistência a Amicacina. Em relação à Gentamicina (50% ALM e 24,9 PP) desenvolveram resistência. Em relação à Ceftazidima, Ciprofloxacina e Imipenem (14,3% ALM e 5,8% PP; 26,8% ALM e 3,2% PP; 12,5% ALM e 13,2% PP consecutivamente) desenvolveram resistência.

Quando isoladas ambas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (mucóide e não mucóide), os antibióticos que apresentaram elevada sensibilidade foram o Ceftazidima e o Imipenem (55,4% ALM e 66,9% PP; 63,5% ALM e 52,3% PP consecutivamente).

Quadro 16- Perfil de susceptibilidade *P. aeruginosa* versus Aminoglicosídeos



Quadro 17- Perfil de susceptibilidade *P. aeruginosa mucóide* versus Aminoglicosídeos



Quadro 18- Perfil de susceptibilidade *P. aeruginosa* e *P. a. mucóide* versus Cefalosporina

Ceftazidima GRUPO=(ALM) versus <i>P. aeruginosa</i>									
<i>cefta</i>	Frequency	Percent	Cum			95% Conf Limits			
0	33	17.91%	17.9%						
1	57	30.9%	48.0%			0	6.0%	15.7%	
2	31	16.8%	64.8%			1	26.8%	41.6%	
3	10	5.4%	70.23%			2	12.9%	25.2%	
4	51	21.7%	100.0%			3	2.9%	10.7%	
Total	184	100.0%	100.0%			4	24.6%	39.2%	

Ceftazidima GRUPO=(PP) versus <i>P. aeruginosa</i>									
<i>cefta</i>	Frequency	Percent	Cum Perc			95% Conf Limits			
0	27	12.1%	12.1%						
1	86	44.1%	44.1%			0	0.0%	1.9%	
2	11	5.6%	49.7%			1	37.0%	51.4%	
3	4	2.1%	51.8%			2	2.8%	9.9%	
4	94	48.2%	100.0%			3	0.6%	5.2%	
Total	222	100.0%	100.0%			4	41.0%	55.5%	

Ceftazidima GRUPO=(ALM) versus <i>P. aeruginosa mucóide</i>									
<i>cefta</i>	Frequency	Percent	Cum Perc			95% Conf Limits			
0	9	8.4%	8.4%						
1	19	17.8%	26.2%			0	3.9%	15.4%	
2	16	15.0%	41.1%			1	11.0%	26.3%	
3	11	10.3%	51.4%			2	8.8%	23.1%	
4	52	48.6%	100.0%			3	5.2%	17.7%	
Total	107	100.0%	100.0%			4	38.8%	58.5%	

Ceftazidima GRUPO=(PP) versus <i>P. aeruginosa mucóide</i>									
<i>cefta</i>	Frequency	Percent	Cum Perc			95% Conf Limits			
0		0.0%	0.0%						
1	85	45.7%	45.7%			0	0.0%	2.0%	
2	11	5.9%	51.6%			1	38.4%	53.1%	
3	2	1.1%	52.7%			2	3.0%	10.3%	
4	88	47.3%	100.0%			3	0.1%	3.8%	
Total	186	100.0%	100.0%			4	40.0%	54.7%	

Quadro 19- Perfil de susceptibilidade *P.aeruginosa* e *P.a. mucóide* versus Fluoroquinolona

Ciprofloxacina, GRUPO=(ALM) versus <i>P.aeruginosa</i>									
<i>cipro</i>	Frequency	Percent	Cum Perc		95% Conf Limits				
0	16	8.9%	8.9%		0	5.2%	14.0%		
1	65	36.1%	45.0%		1	29.1%	43.6%		
2	42	23.3%	68.3%		2	17.4%	30.2%		
3	13	7.2%	75.6%		3	3.9%	12.0%		
4	44	24.4%	100.0%		4	18.4%	31.4%		
Total	180	100.0%	100.0%						

Ciprofloxacina, GRUPO=(PP) versus <i>P.aeruginosa</i>									
<i>cipro</i>	Frequency	Percent	Cum Perc		95% Conf Limits				
0	18	8.1 %	8.1%		0	0.0%	1.8%		
1	90	40.5%	48.6%		1	37.2%	51.2%		
2	17	7.6%	56.2%		2	4.9%	13.0%		
3	1	0.5%	56.7%		3	0.0%	2.7%		
4	96	43.2%	100.0%		4	40.1%	54.2%		
Total	222	100.0%	100.0%						

Ciprofloxacina, GRUPO=(ALM) versus <i>P.aeruginosa mucóide</i>									
<i>cipro</i>	Frequency	Percent	Cum Perc		95% Conf Limits				
0	7	6.3%	6.3%		0	2.6%	12.6%		
1	19	17.1%	23.4%		1	10.6%	25.4%		
2	30	27.0%	50.5%		2	19.0%	36.3%		
3	12	10.8%	61.3%		3	5.7%	18.1%		
4	43	38.7%	100.0%		4	29.6%	48.5%		
Total	111	100.0%	100.0%						

Ciprofloxacina, GRUPO=(PP) versus <i>P.aeruginosa mucóide</i>									
<i>cipro</i>	Frequency	Percent	Cum Perc		95% Conf Limits				
0	0	0.0%	0.0%		0	0.0%	1.9%		
1	92	48.9%	48.9%		1	41.6%	56.3%		
2	6	3.2%	52.1%		2	1.2%	6.8%		
3	0	0.0%	52.1%		3	0.0%	1.9%		
4	90	47.9%	100.0%		4	40.5%	55.3%		
Total	188	100.0%	100.0%						

Quadro 20- Perfil de susceptibilidade *P.aeruginosa* e *P.a. mucóide* versus Carbapenêmicos

Imipenem, GRUPO=(ALM) <i>P.aeruginosa</i>							
<i>imipe</i>	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Percent</i>		95% Conf Limits		
0	16	8.9%	8.9%		0	5.2%	14.1%
1	68 – 53	38.0%	46.9%		1	30.9%	45.5%
2	25 – 57	14.0%	60.9%		2	9.2%	19.9%
3	7 – 9	3.9%	64.8%		3	1.6%	7.9%
4	63 – 44	35.2%	100.0%		4	28.2%	42.7%
Total	179	100.0%	100.0%				

Imipenem, GRUPO=(PP) <i>P.aeruginosa</i>							
<i>imipe</i>	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Perc</i>		95% Conf Limits		
0	0	0.0%	0.0%		0	0.0%	1.8%
1	79 – 55	38.7%	38.7%		1	32.0%	45.8%
2	19 -38	9.3%	48.0%		2	5.7%	14.2%
3	31 -23	15.2%	63.2%		3	10.6%	20.9%
4	75 -84	36.8%	100.0%		4	30.1%	43.8%
Total	204	100.0%	100.0%				

Imipenem, GRUPO=(ALM) <i>P.aeruginosa mucóide</i>							
<i>imipe</i>	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Perc</i>		95% Conf Limits		
0	7	6.3%	6.3%		0	2.6%	12.6%
1	21	18.9%	25.2%		1	12.1%	27.5%
2	14	12.6%	37.8%		2	7.1%	20.3%
3	6	5.4%	43.2%		3	2.0%	11.4%
4	63	56.8%	100.0%		4	47.0%	66.1%
Total	111	100.0%	100.0%				

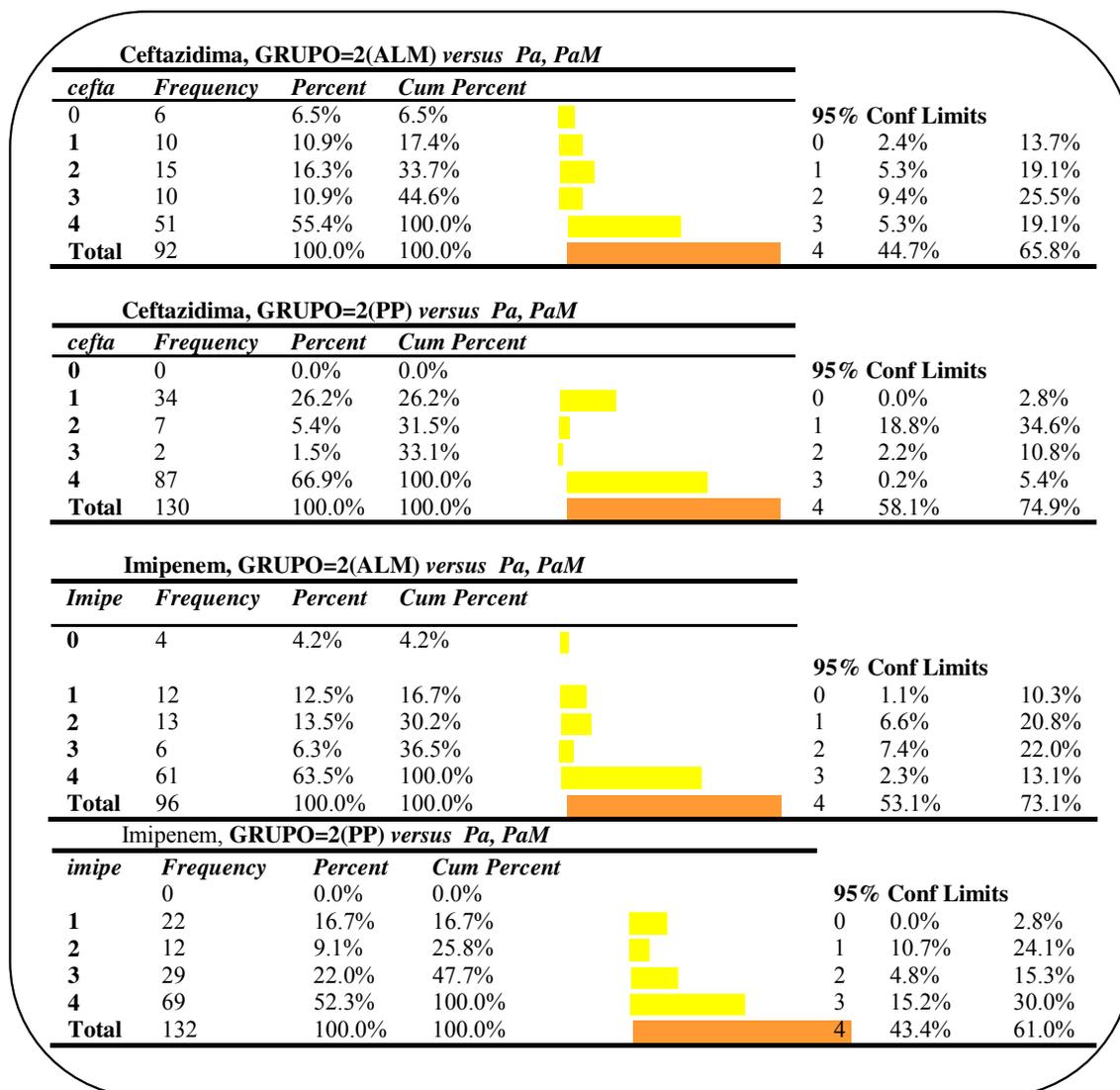
Imipenem, GRUPO=(PP) <i>P.aeruginosa mucóide</i>							
<i>imipe</i>	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Perc</i>		95% Conf Limits		
0	0	0.0%	0.0%		0	0.0%	1.9%
1	55	29.3%	29.3%		1	22.9%	36.3%
2	25	13.3%	42.6%		2	8.8%	19.0%
3	32	17.0%	59.6%		3	11.9%	23.2%
4	76	40.4%	100.0%		4	33.3%	47.8%
Total	188	100.0%	100.0%				

Quadro 21- Perfil de susceptibilidade *Staphylococcus aureus* versus Penicilina

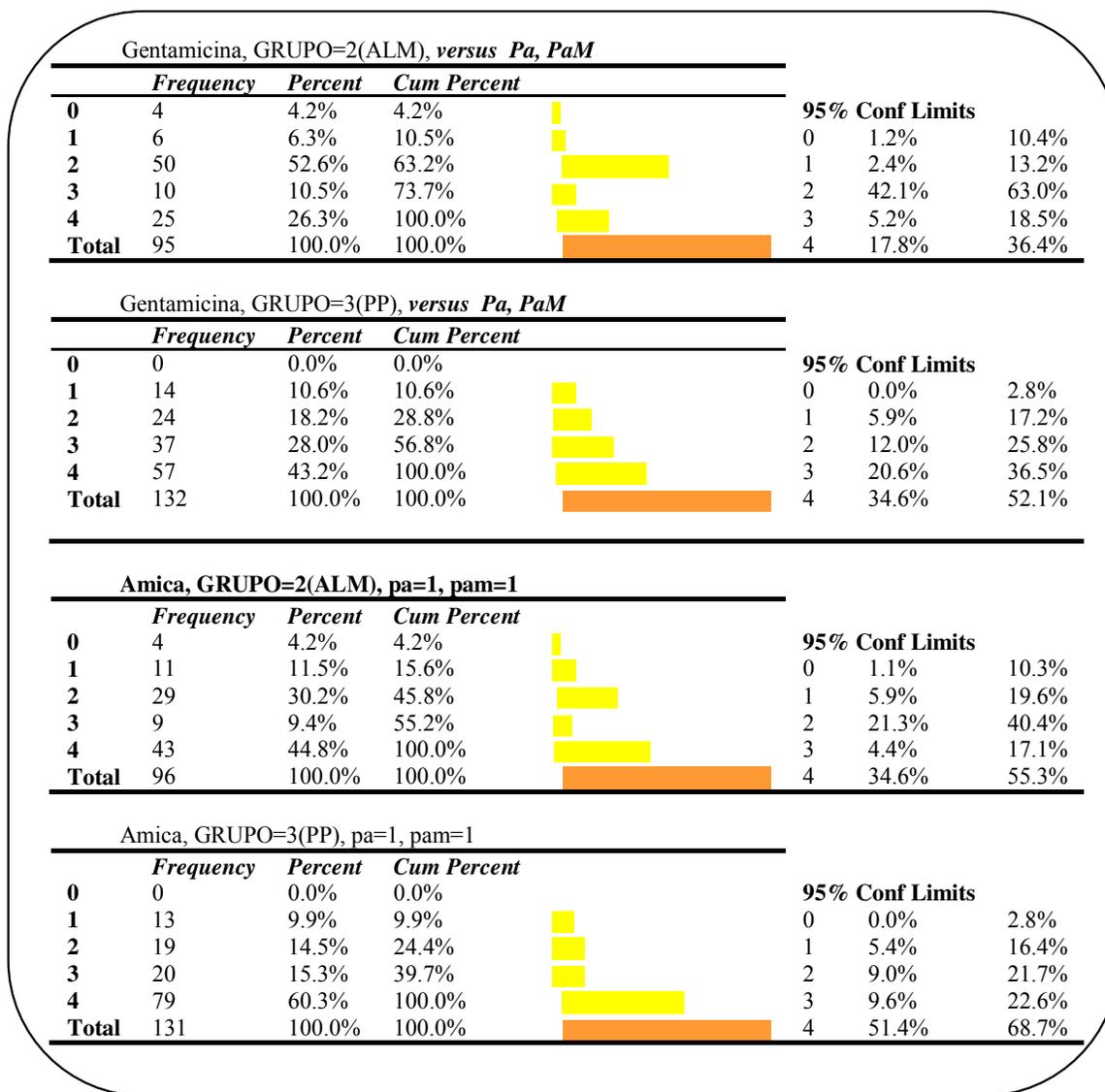
Oxacilina versus <i>Staphylococcus aureus</i> isolados GRUPO=2 (ALM)			
	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Percent</i>
<i>oxa</i>			
0= ñ fez antibiograma	39	21.3%	21.3%
1= sensível	133	72.7%	94.0%
2= resistente	11	6.0%	100.0%
Total	183	100.0%	100.0%

Oxacilina versus <i>Staphylococcus aureus</i> isolados GRUPO=3 (PP)			
	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum Percent</i>
<i>oxa</i>			
0= ñ fez antibiograma	0	0.0%	0.0%
1= sensível	195	100.0%	100.0%
2= resistente	0	0.0%	100.0%
Total	195	100.0%	100.0%

Quadro 22- Estudo de Susceptibilidade Antimicrobiana aos 2 morfotipos *P. aeruginosa* e *P. a. mucóide*, quando isoladas concomitantemente no mesmo CRD, *versus* Cefalosporinas 3a. geração (Ceftazidima), Carbapenêmicos (Imipenem), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) .



Quadro 23- Estudo de Susceptibilidade Antimicrobiana aos 2 morfotipos *P. aeruginosa* e *P. a. mucóide*, quando isoladas concomitantemente no mesmo CRD, versus Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina).



4.5- Resultados das três bases de dados (REP, ALM e PP)

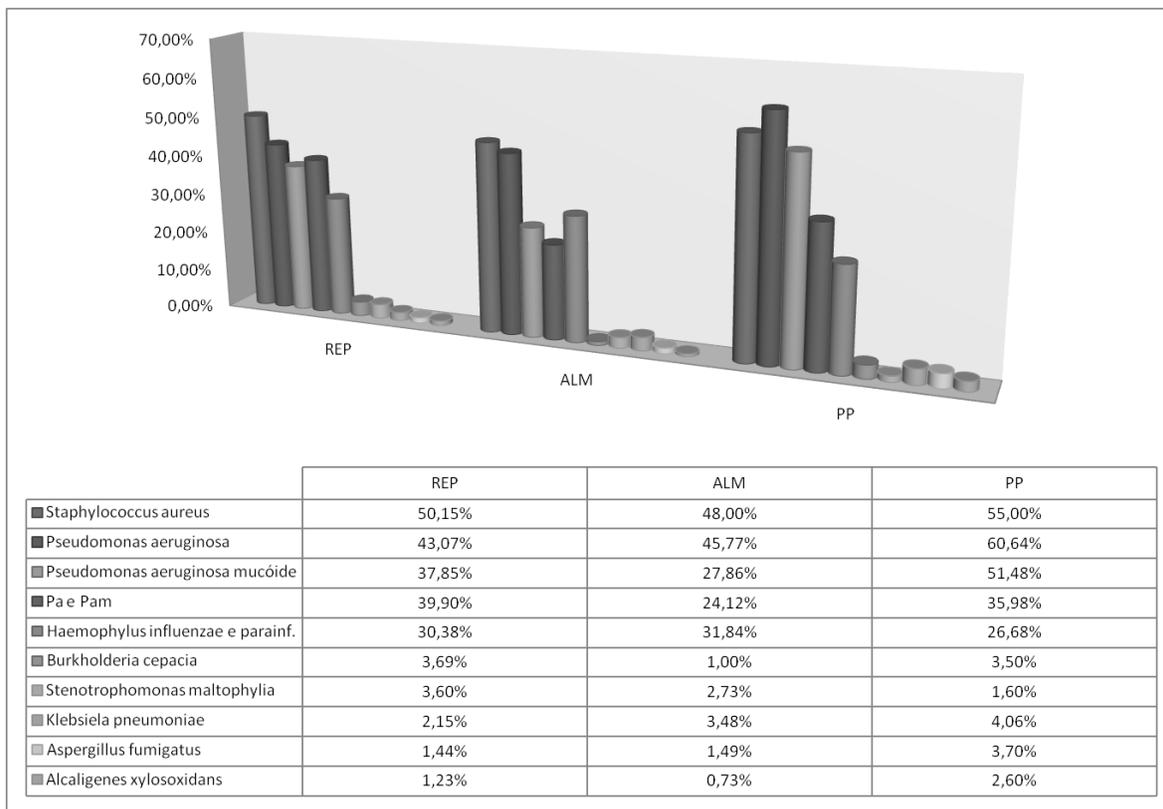
Os resultados abaixo estão plotados em mesma tabela e gráfico, para melhor visualização dos resultados das três bases (Tabela 12 e Figura 09), sendo que o ultimo gráfico Erro Bar, verificou a coerência entre os bases dados (médias intervalo de confiança 95 % IC).

Tabela 15- Análise descritiva dos diferentes microrganismos resgatados das três bases de dados analisadas, sobre o numero de CRD (1as. colunas), como por paciente (2as. colunas) (REP, ALM e PP)

MICRORGANISMO	Análise descritiva				Análise descritiva				Análise descritiva			
	REP		ALM		PP		REP		ALM		PP	
	N	CRD [∨]	N	PAC [†]	N	CRD [∨]	N	PAC [†]	N	CRD [∨]	N	PAC [†]
	975	%	100	%	402	%	100	%	370	%	9	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	489	50,1	76	76	193	48	71	71	205	55	9	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	420	43	59	59	184	45,8	68	68	225	60,6	8	88,90
<i>Pseudomonas aeruginosa mucóide</i>	389	40	54	54	112	27,8	48	48	191	51,4	9	100
<i>P.aeruginosa e P.a. mucóide</i>	389	40	61	61	97	24,1	43	43	133	35,9	8	88,90
<i>Haemophylus influenzae e parainfluenzae</i>	296	30,5	69	69	128	31,8	65	65	99	26,6	9	100
<i>Burkholderia cepacia</i>	36	3,7	11	11	4	1	3	3	13	3,5	4	44,44
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	2,2	15	15	14	3,4	10	10	15	4,1	6	66,66
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29	3	16	16	11	2,7	9	9	6	1,6	1	11,11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14	1,5	8	8	6	1,5	6	6	14	3,7	5	55,00
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	12	1,2	6	6	3	0,7	2	2	10	2,6	3	33,33

[∨] denominador total de CRD em cada base dado;

[†] denominador total de pacientes em cada base dado



†Denominador CRD: 975 REP, 402 ALM e 370 PP.

Figura 10- Perfil microbiológico de pacientes com FC nas três bases dados (REP, ALM e PP†).

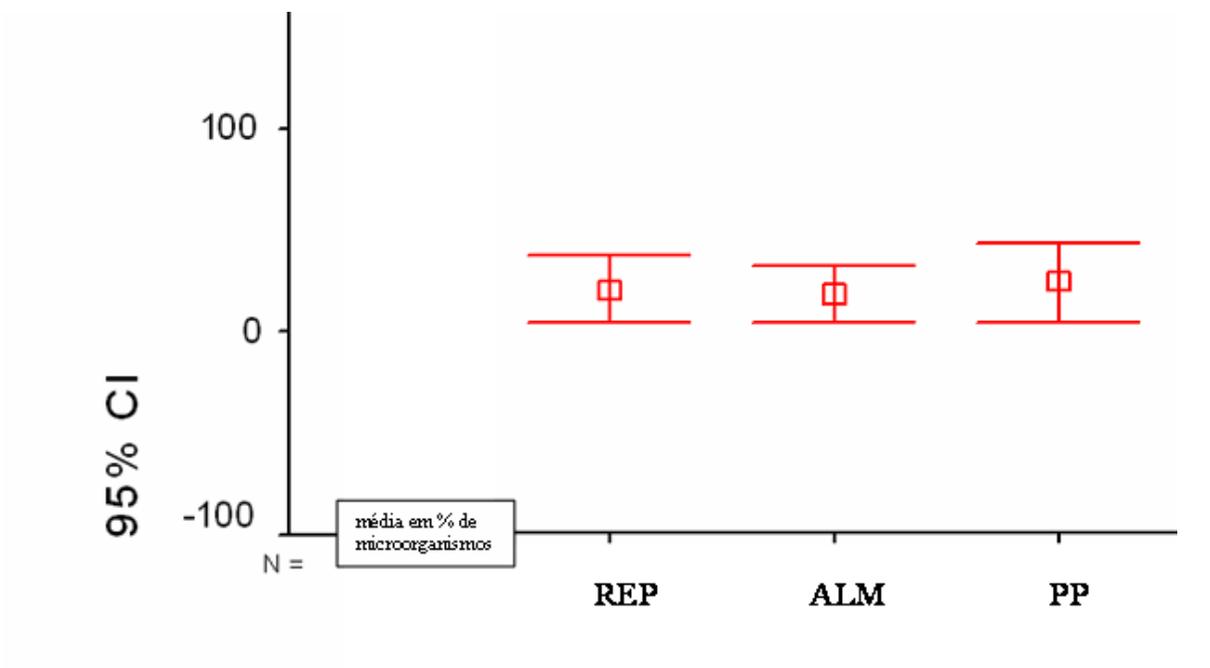


Figura 11- Gráfico ‘bidimensional Error Bar Plot’ - interactive Graph, para análise das médias das frequências dos microrganismos, utilizando a média do intervalo de confiança IC 95 % no REP, ALM e PP.

5- DISCUSSÃO

A morbidade e mortalidade nos pacientes com FC resultam principalmente das manifestações pulmonares (Ferkol et al., 2006). Acredita-se que as exacerbações pulmonares sejam conseqüências da interação entre o epitélio respiratório, a presença de células imunes (inflamatórias) e a presença de microrganismos, normalmente ausentes nos indivíduos sadios (Ordonez, 2003; Smith, 1999). Corroborando esta hipótese, tem sido descrito que nas exacerbações pulmonares dos pacientes cronicamente infectados com *Pseudomonas aeruginosa*, geralmente resultam de uma expansão clonal das colônias dos microrganismos presentes (biofilme) nos pacientes estáveis do que aquisição de novas colônias (Aaron et al., 2002; Saiman et al., 2004).

A identificação acurada e sistemática dos microrganismos no trato respiratório dos pacientes FC e sua variação ao longo do tempo permite uma abordagem profilática e terapêutica mais adequada no manuseio destes pacientes (Connet et al., 2006).

No atendimento ambulatorial de nossos pacientes FC, seguimos o protocolo de solicitar um CRD's a cada consulta (3 a 4 vezes/ano) naqueles pacientes não infectados cronicamente com *Pseudomonas* e pelo menos uma CRD's a cada 6 meses naqueles já cronicamente infectados e/ou frente a toda exacerbação pulmonar.

Nossos resultados mostraram que a prevalência dos microrganismos encontrados nas secreções, coletadas durante consultas ambulatoriais de rotina ou nas exacerbações pulmonares, estão de acordo, com pequenas variações, com os achados anotados nos cadernos de microbiologia (ALM) e arquivados nos prontuários dos pacientes (PP), e com os achados em outros centros de atendimento aos pacientes com FC.

Três hipóteses explicariam as pequenas variações entre os percentuais dos microrganismos resgatados dos PP's em relação às bases REP e ALM e suas características como: pacientes com mais de 10 anos de acompanhamento e com maior média de idade (16 PP, 10 REP e 12 ALM) e a média de exames realizados por ano (1,8 REP, 3,3 ALM enquanto que a média de exames realizados no PP foi de 4,4 exames/ano). Ocorreu a distribuição de microrganismo esperada nas bases de dados, onde os períodos de acompanhamento *versus* idade avançada e evolução dos microrganismos estão geralmente correlacionados à maior da doença (Ferkol et al., 2006, Smith A 2006, Aaron et al 2005, Magalhães et al., 2005).

Em nosso estudo calculamos a prevalência (%) de microrganismos selecionados através de duas variáveis principais (independentes) como descritos em alguns estudos internacionais (Saiman et al., 2005, Govan and Deretic 1996):

- em relação ao numero **total de CRD's** (utilizado em estudos de prevalência durante longos períodos, para Análise de evolução por ano e por faixa etária, somando cada microrganismo isolado) .
- em relação **aos pacientes** (casuística) (foi utilizado no estudo de acometimento dos pacientes por determinado microrganismo e Análise de incidência conta-se uma só vez para cada microrganismo).

A prevalência dos microrganismos foi calculada por estes dois denominadores (CRD e pacientes), com o propósito de haver maior comparabilidade entre os estudos, evitando o viés da diferença de denominador.

Pelos resultados, verificou-se uma redução significativa de *Haemophylus influenzae* (**p=0.020**) e *Klebsiela pneumoniae* (**p=0.016**), já discutidos em alguns estudos específicos (Gilligan, 1991).

Em relação à prevalência da *Burkholderia cepacia*, devemos considerar que apenas durante o ano de 2003 foi utilizado o meio seletivo para seu cultivo no HC/Unicamp, elevando a prevalência de isolados para 13% (Barth, 2005). Ao longo do período do estudo dos resultados das CRD's REP, este valor se aproximou aos relatos publicados pelo Registro Americano e *Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference*, e o observado em São Paulo 4,2%, no Paraná 4,4%, mas muito inferior que o observado em Pernambuco (29,2%). (Saiman et al., 2005; Silva Filho, 2002; Souza, 2005, Saiman, 2003).

Em nosso estudo verificamos que as crianças foram colonizadas precocemente pelas *P.aeruginosa* em nosso Centro (57%) durante o primeiro ano de vida (0-5), semelhante ao estudo anterior de Barth (2005) e aos de outros centros no Brasil, como Pernambuco em (75%), com o diferencial que os estudos relatam a frequência durante os 5 primeiros anos de vida (Magalhães et al., 2001).

Segundo dados da *Cystic Fibrosis Foundation* (Saiman et al., 2004), em um estudo semelhante com um n=25.000 CRD's, a idade de acometimento da infecção por *P.aeruginosa* ocorreu em 20% dos pacientes americanos nos primeiros 5 anos de vida, o mesmo também por centros Europeus descrito por Döring et al (2000).

A hipótese provável para a diferença entre prevalência encontrada em crianças de 0-5 anos em Recife, é o denominador utilizado no cálculo estatístico não descrito na metodologia. Neste estudo, para o cálculo da prevalência geral dos microrganismos foi utilizado como denominador o n=espécimes (total de CRD's), e para o percentual calculado por faixa etária, o denominador foi o n=paciente. O estudo também de outros estados não são comparáveis com este quesito em nosso estudo, porque utilizamos o método estatístico para analisar a evolução da frequência dos microrganismos de acordo com a faixa etária, aonde há uma aproximação entre os pontos (regressão linear) para diminuir os vieses de uma curva. Estudos comparáveis aos resultados da evolução por faixa etária são os descritos por Saiman et al (2005) na *Cystic Fibrosis Foundation e Consenso Europeu* por Döring et al. (2006).

Mais um aspecto observado em questão a distribuição dos microrganismos à faixa etária, foi um ponto de intersecção (11-14 anos) entre os morfotipos de *P. aeruginosa* (elevação da frequência do morfotipo mucóide e diminuição da frequência do morfotipo não mucóide) (Saiman et al., 1995, Ribeiro AF, 2005).

A prevalência do *Staphylococcus aureus* por paciente: (76% no REP / 71% nos ALM e 100% nos prontuários) foi próxima a descrita por Alvarez et al em 2004 e Barth em 2005 com 80% (n=96) e 92% (n=76) respectivamente.

A prevalência do *Staphylococcus aureus* por CRDs: (50,15% no REP / 42,5% no ALM e 55% nos prontuários). Foi mais alta que a encontrada em outros centros brasileiros (Pernambuco 29,9%, Bahia 28,9%, e Paraná 39,3%) (Magalhães, 2004; Silva Filho, 2002; Santana, 2003; Souza, 2005, e que o relatado pela Registro Americano de fibrose cística 37,5% (Saiman et al., 2003).

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* por paciente: (59% no REP / 68% nos ALM e 100% nos prontuários) foi próxima a descrita por Alvarez et al em 2004 e Barth em 2005 com 76% (n=96) e 88,2% (n=76) respectivamente.

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* por CRDs: (43,7% no REP / 47,8% no ALM e 60,6% nos prontuários) foi comparável com 65,3% em Pernambuco, 48,5% no Paraná e 58,7%, no relato do Registro Americano de fibrose cística (Magalhães, 2004; Silva Filho, 2002; Santana, 2003; Souza, 2005, Saiman, 2003).

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* mucóide por paciente: (54% no REP / 48% nos ALM e 89% nos prontuários) foi próxima a descrita por Alvarez et al (2004) e Barth (2005) com 53% (n=96) e 72,4% (n=76) respectivamente.

A prevalência da *Pseudomonas aeruginosa* mucóide por CRDs: (37,9% no REP / 27,86% no ALM e 51,5% nos prontuários)

Não encontramos relatos sobre a prevalência do morfotipo mucóide por CRDs nos relatos dos estudos no Brasil.

A prevalência dos *Pseudomonas aeruginosa* em nosso centro é significativa, principalmente pela alta incidência na faixa etária de 0 a 1 ano em nossos pacientes, enquanto que outros centros relatam uma prevalência nos 5 primeiros anos de vida:

A infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* tem sido relatada na literatura como fator de prognóstico para a sobrevida dos pacientes FC. (Ferkol et al 2006, Santana et al 2003, Souza et al 2005).

Em relação à resistência antimicrobiana, não foi possível analisá-la no REP por não ter selecionado as variáveis pertinentes a este estudo junto ao NIHC.

Na análise dos dados resgatados dos arquivos do laboratório de microbiologia, relativos ao período de 1 ano, e ao longo de mais de 10(anos) dos resultados advindos dos PP's, observamos uma elevação de resistência das *Pseudomonas aeruginosa* principalmente para os antibióticos freqüentemente utilizados como a Gentamicina, Amicacina e de maneira menos acentuada para a Ceftazidima e o Imipenem, similar a literatura. O que se observou diferente da literatura foi à baixa incidência da resistência do *Staphylococcus aureus* a Oxacilina apesar de uma incidência elevada e persistente (MSSA).

Foi possível observar resistência das cepas *P. aeruginosa* aos antibióticos freqüentemente utilizados como a Gentamicina (50%) e Amicacina (31%). As mesmas cepas foram sensíveis a Ceftazidima (45%), Ciprofloxacina (48,7%). Em 389 CRD's (ALM), ambos morfotipos foram isolados (mucóide e não mucóide) apresentando elevada sensibilidade ao Ceftazidima, Imipenem e Amicacina (66,9, 56,3% e 60% respectivamente)

e dentre eles o que apresentou maior eficácia e menor resistência foi a Ceftazidima (5,4%). As cepas de *S. aureus* apresentaram elevada sensibilidade (72,7% ALM e 100% PP) sendo que apenas 11 cepas de 183 amostras (6% ALM) em 5 (1,2%) pacientes.

Para atingirmos o objetivo geral do nosso estudo que foi definir o perfil microbiológico das secreções respiratórias de nossos pacientes com FC, tendo em vista a importância desse fato na evolução destes pacientes, buscamos o Registro Eletrônico de Prontuários. As dificuldades encontradas para o aproveitamento das informações podem estar relacionadas com uma baixa transferência dos resultados das CRD's para o banco eletrônico devido à seleção de variáveis pelo código de especialidade de atendimento diferente do ambulatório de FC (32045). Também o uso de diferentes critérios e códigos de plotagem dos dados além da falta de avaliação do sistema.

Nos Arquivos dos registros do Laboratório de Microbiologia só pudemos resgatar as informações de um ano, mas seguramente corresponderam à totalidade dos exames realizados no período com todas as informações registradas, porém há limitações descritas na literatura como furto, desvio, falta espaço, demora para a coleta de dados.

E nos prontuários, fonte mais completa de informações sobre o paciente, buscamos cerca de 10% dos pacientes (9 pacientes com mais de 10 anos de seguimento) que compuseram a casuística do REP (100) e dos arquivos do laboratório de microbiologia (100).

Abaixo os limites encontrados e as ações detalhadas para evitar os vieses:

- Falta padronização no cadastramento de resultados,
- Limite de espécies de microrganismos que podem ser cadastrados por laudo CRD,
- Pedidos de CRD's cadastrados em ambulatórios diferentes ao da FC,
- Registros de microrganismos na vertical, onde cada espécie repetida (plotado) quantas vezes forem os testes antibiograma,
- Falta planejamento com as equipes interesse: laboratório, clínico e profissionais da informática,

- Ações que evitaram alguns dos ‘vieses’ REP:
- Interpretação dos dados digitados (profissionais do laboratório e orientador) e para corrigir foi utilizado s as ferramentas localizar e substituir (Access e Excel) para tabular dados corretamente (Welcher et al., 2006),
- Foram incluídos os microrganismos de maior importância clínica para a fibrose cística de acordo com a literatura (Ribeiro JD 2002, Ribeiro AF 2005), o que coincidiu com as espécies cadastradas no REP,
- Foram coletadas as mesmas variáveis em ALM e PP (mesma casuística), foram resgatados dados para verificar coerência entre as bases de dados com os laudos arquivados nos prontuários e anotados nos cadernos especiais de microbiologia (% microrganismos),
- Formatamos um novo banco de dados REP, auditado pelo estatístico da FCM de acordo com a base dado REP original (NIHC), eliminando as variáveis repetidas (não pertinente) em um mesmo CRD, sem interferir nas variáveis do estudo,

Limites observados nas outras bases de dados ALM e PP:

- Os PP’s são arquivos dos laudos originais das CRD’s, e os ALM são anotações dos profissionais com todo detalhamento de cada resultado CRD, mesmo assim encontramos vários problemas conhecidos e descritos literatura em estudos retrospectivos (Welcher et al., 2006),
- Algumas das causas de possíveis vieses encontradas: perda, desvio, falta espaço e demora em acessar todas as pastas pertencentes aos 9 pacientes, compondo todo o histórico de cada um deles,
- Vieses difíceis de corrigir em comparação ao uso do REP que podem se amoldar as perspectivas de futuras pesquisas científicas na área de saúde, sugerindo:
- Novos estudos baseados em grandes bases de dados como registros eletrônicos *versus* resultados laboratoriais desde que envolva maior planejamento, correção vieses, treinamento e maior interação entre as equipes. Registros eletrônicos dos pacientes podem colaborar para estudos que envolvem longos períodos, estudos multicêntricos e com grandes bases de dados.

6- CONCLUSÃO

Da análise dos resultados deste estudo podemos concluir que o perfil microbiológico das secreções respiratórias dos pacientes com FC avaliados tem como características principais:

- 1- Infecção muito precoce e progressiva dos pacientes pela *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2- Prevalências mais elevadas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas secreções respiratórias dos pacientes, quando comparadas com outros centros de referência.
- 3- Níveis elevados de resistência antimicrobiana dos *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos frequentemente utilizados no tratamento da FC e baixos níveis de resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* a Oxacilina.
- 4- A Prevalência dos microrganismos emergentes variou de acordo com a existência de meios seletivos e específicos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. 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* 2002; 40:4172-9.

Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, Tullis E, et al. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:811-5.

Akabas MH. *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 2000; v.6, 375:3729-32.

Alas Smyth. Update on treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12:440-444.

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80:371-9

Amalfi LM, Bertuzzo CS, Ribeiro JD, Ribeiro AF. "Screening" Neonatal ampliado para fibrose cística em recém-nascidos na Dir XV Estado de São Paulo: Gestão e Implementação [resumo]. *Rev Med Minas Gerais* 2005; 15(2 Supl 1):S48-110. [Pôster In: IIIº Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal 2005; nov. 16-19; São Paulo].

Anvisa. Ministério da Saúde. Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V. Brasília (DF); 2004.

Ashlock, MA. Cystic Fibrosis in the 21st century. (Progress in respiratory research vol.34) Edited by Andrew Bussh, Eric WFW Alton, Jane C. Davis, Uta Griensenbach, and Adam Jaffe. 329pp., illustrated. Basel, Switzerland, Karger, 2006. *N Engl J Med* 2006; 354(18).

Bange FC, Kirschner P, Böttger EC. Recovery of Mycobacteria from patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3761-63.

Baquero F, Alvarez ME, Cantón R. Bacteriologic diagnosis of respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2(1): 2s10-15.

Barth AL e Pitt TL. The high amino acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1995; 45:110-119.

Barth AL e Pitt TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 33(1):37-40,

Barth AL, Pitt TL. Microbial pathogens associated with Cystic Fibrosis: Special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. Braz J Infect Dis 1998; 2(2):43-61.

Barth AL e Pitt TL. Requerimentos nutricionais de *Pseudomonas aeruginosa* em fibrose cística. Caderno de Farmácia 1999; 15(2):81-2.

Barth LR. Perfil microbiológico e indicadores de gravidade em pacientes com fibrose cística. [Tese - Doutorado]. Campinas SP: Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp; 2005.

Bebarry S, Ellis L, Corey M, Marcon M, Durie P. How useful is fecal pancreatic elastase 1 as a marker of exocrine pancreatic disease? The Journal of Pediatrics 2002; 141(1):88-90.

Borowitz D, Baker SS, Duffy YL, Fitzpatrick L, Gyamfi J, Jarembel K. Use of fecal elastase-1 to classify pancreatic *status* in patients with cystic fibrosis. J of. Pediatr 2004, 145:322-6.

Brasil. Ciência, Tecnologia & Meio Ambiente – Agência Brasil – Radiobrás. Unifesp detecta “superbactéria” com defesas inéditas contra antibióticos. Disponível em: URL: http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia_100502_5.htm 2002; 1-3.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal. Brasília (DF); 2003. 90p.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica. Tradução de Patricia Josephine Voeux. 21º ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2000. 611p. Título original: Jawetz, Melnick & Adelberg Medical Microbiology.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. New York: Ed Lange Medical Books; 2004. 818p. 23rd ed.

Cabello GMK, Cabello PH, Roig SRS, Fonseca AI. Cystic fibrosis in “screening” by two-trued newborn IRT assay and Δ F508 mutation molecular analysis. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39(1): 15-20.

Camargo José J.. Lung transplant in children. *J. Pediatr. (Rio J.)* [serial on the Internet]. [cited 2008 May 28]. Available from://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572002000800002&lng=en&nrm=iso. doi: 10.1590/S0021-755720020 0080000 2.

Campbell, PW. Detection of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* using PCR. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20:40-9.

Conye T. Tópico de microbacteriologia. Infecções Novas e Emergentes no Trato Respiratório de Pessoas com Fibrose Cística. Disponível em URL: http://www.cfw.org/pub/edition_3/Portuguese/New_and_Emerging_Respiratory_Tract_Infections_Portuguese.html 2007.

Cassola AC. Atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: Canais iônicos. *J Bras Nefrol* 2000; 22(3):176-80.

Chen JS. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr* 2001; 139: 643-49.

Connet G, Legg J, Forsclick K, Rogers G, Bruce K. Bacterial diversity in sputum from children with Cystic Fibrosis. *Arch Dis Child*, 2006; 91(S 1):A50.

Cornaglia G, Russel K, Satta G, Fontana R. Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobio Agents Chemother*, 1995; 39:350-355.

Correa CAA. Prevalência das seis mutações mais frequentes no gene CFTR entre portadores da fibrose cística [Dissertação - Mestrado]. Campinas SP: Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp; 2004.

Costa CGA. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de um sistema de prontuário eletrônico do paciente, baseado nos paradigmas da World Wide Web, e da engenharia de software. Campinas, SP: 2001; [s.n.].

Cunha MV. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by Cystic Fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. J Clin Microbiol 2004; 7(42): 3052-58.

Cystic Fibrosis Trust. Standards for the Clinical Management of Children and Adults with Cystic Fibrosis. New Jersey. 2001.

Damrosch, Douglas S., "Dorothy Hansine Andersen," Journal of Pediatrics, October, 1964, pp. 477-479.

Davis PB. Pathophysiology of cystic fibrosis with emphasis on salivary gland involvement. J Dent Res 1987; 667-71.

Döring G. Antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000; 16:749-67.

Ester CR, Henry MM, Molina PL, Leigh MW. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2005; 40:39-44.

Farias L, Rosário Filho NA, Kovalhuk L. Aspectos clínicos da fibrose Cística. Experiência no Hospital de Clínicas da UFPR, 1980-1996. Pediatr 1997, v. 4, 19: 241-48.

Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova AB, Zeng L, Lai H, et al. The Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal "Screening" Study Group - Early Diagnosis of Cystic Fibrosis Through Neonatal "Screening" Prevents Severe Malnutrition and Improves Long-Term Growth. Pediatrics 2001; 107(1):1-13.

Farrell M, Farrell PM. Newborn "screening" for cystic fibrosis: ensuring more good than harm. J Pediatr 2003; 143(6):707-12.

Ferkol T, Rosenfeld M, Milla C. Cystic Fibrosis Exacerbations. J Pediatr 2006; 148:256-64.

Ferreira LL. Estrutura clonal e multirresistência em *P.aeruginosa* [Dissertação]. Rio de Janeiro: INCQS FIOCRUZ; 2005.

Friedrich LV, White RI & BOSSO JA. Impact of use of multiple antimicrobials on changes in susceptibility of Gram-negative aerobes. *Clin Infect Dis*, 1999; 28:1017-1024.

Gaspareto P, Martins A, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of BlaSPM-1 and BlaIMP-1 genes of Metallo-beta-Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three University Hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol* 2007; 38(1):108-109.

Gibson, LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatr* 1959; 23:545-49. PH. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol* 1991; 1(4): 35-51.

Gilligan PH. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1):35-51.

Gilligan PH, Kiska PL, Appleman MD. CUMITECH 43 Cystic Fibrosis Microbiology. Ed A&M Press; 2006. p.1-36.v.43

Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in Cystic Fibrosis: *mucoïd Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Ver* 1996, 3(60):539-74.

Gray MA, O'Reilly C, Winpenny J, Argent B. Functional Interactions of HCO₃⁻ with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *JPancreas* Disponível em: URL: <http://www.joplink.net> 2001; 2(4 Suppl): 207-11.

Gropper AM, Wiener-Kronish J. The epithelium in acute lung injury / acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Critical Care* 2008; 14:11-5.

Gullo L, Ventrucci M, Tomassetti P, Migliori M, Pezzilli R. Fecal Elastase 1 determination in chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1999; 44(1):210-13.

Guthrie R. The origin of newborn "screening". *Screening* 1992; 1:5-15.

Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis, 1998; 27: S93-99.

Henry DA. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with Cystic Fibrosis and use of a simple new selective medium. J Clin Microbiol 1997; 3(35):614-619.

Henry DA. Phenotypic methods for determining genomovar *status* of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 1998, 3(39):1073-1078.

Hudson VM. Pathogenesis of Cystic Fibrosis. Treat Respir Med 2004; 3(6): 350-63.

Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35:1697-1704.

Johnson LR. Essential Medical Physiology. 2^o ed. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia: USA 2000.

Keren B, Rommens JM, Buchanan JÁ, Markiewicz D, Coz TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245:1073-80.

Kierszenbaum AL. Histologia e biologia celular – Uma introdução à patologia. Tradução: Nadia Vieira Rangel, Rodrigo Alves Azevedo. 1^o ed. Rio de Janeiro. Ed. Elsevier. 2004. 654. Histology and cell biology: an introduction to pathology. RS. 1997. p. 117-130.

Kilian M. *Haemophilus*. In: Murray PR., et al. Manual of Clinical Microbiology. 8. ed. Washington: ASM press, 2003. 1212 p.

Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR et al. Manual of Clinical Microbiology. 8. Ed. Washington: ASM press, 2003. 1212 p.

Koneman EK, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and TextBook of Diagnostic Microbiology. 5^o ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1997.

Koneman EK, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido. Tradução de Arlete Emily Cury. 5^o ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2001. 1465. Color Atlas and TextBook of Diagnostic Microbiology.

Kroll CM, Terra JP. Bactérias isoladas em cultura de escarro e secreção de orofaringe de indivíduos portadores de fibrose cística. Laes Haes 1999; 98-118.

Lemos ACM. Fibrose Cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. J Bras Pneumol 2004; 1(30) 9-13.

Legrys, V. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. J Pediatr 1996; 129(6):892-97.

Levitzky. Pulmonary physiology. England. The MacGraw-Hill Companier, Inc.; 2004. p.183-277 6th ed.

Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol, 1995; 8: 557-584

Livermore MD. Carbapenemases. J Antimicrob Chemother, 1992; 29:609-613.

Lodish H, Berk A, Zipursky AL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Editor Sara Tenney, Katherine Ahr, Paul W. Rohloff. Molecular Cell Biology. 4th Ed. New York, USA: WH Freeman and Company; 2000. 1084.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with Cystic Fibrosis. Clin Microbiol 2002; 2(15):194-222.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brok Biology of Microorganisms. Barcelona Spain. Pearson Education; 2004. p.1-608. v.10.

Magalhães M, Britto MCA, Bezerra PGM, Veras A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórias de fibrocísticos do Recife. J Bras Med Lab, 2004; 4(40):223-7.

Manno G. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending Italian Cystic Fibrosis center. J Clin Microbiol 2004; 4(42):1491-1497.

Manrique EI, Galvão LL. Racionalização e controle de antimicrobianos. In: Richtmann. Infecções hospitalares Prevenção e Controle. Tradução: Rodrigues EAC, Mendonça JMBA, Filho MBAF, Grinbaum RS. 1997. p. 117-130.

Marumo K, Takeda A, Nakamura Y, Nakaya K. Purification and characterization of metallo-beta-lactamase from microorganisms. *Microbiol Immunol*, 1995; 39:27-33.

Matos AP. Análise Preliminar da Cultura Quantitativa de Amostras de Pacientes com fibrose cística e Prevalência de Patógenos. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22, Florianópolis. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2003.

Matos AP. Avaliação da microbiologia e da cultura quantitativa bacteriana de amostras de pacientes com fibrose cística. [Dissertação Mestrado]. Curitiba, PR: Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná; 2005.

Massad E, Marin HE, Azevedo Neto RS, Lira ACO. O prontuário eletrônico do paciente na assistência, informação e conhecimento médico. São Paulo: H. de F. Marin, 2003; 213.

Miller MB, Gilligan PH. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003; 9(41):4009-4015.

Mims C. *Microbiologia Médica*. London: Ed. Mosby; 1995. 489p. 1º ed.

Mims C, Wakelin D, Playfair J, Roitt I, Williams R. *Microbiologia Médica*. Tradução de Ida Cristina Gubert. 2º ed. São Paulo: Manole, 1999. 584p. Título original: *Medical Microbiology*.

Mims DH, Goering R, Roitt I, Wakelin D, Zucherman M. *Microbiologia Médica*. Tradução de, Andréa Del Corso, Luciane Faria Pontes et al. 3º ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2005. 708p. Título original: *Medical Microbiology*.

Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Pocket Companion to Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Boston: USA, 2006.

Morales P, Fernandez, V. Identificación, estructura y expresión del gen CFTR. *Fibrosis Quística* 1997; 1:11-25.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. Tradução de Patrícia Josephine Voeux, Luzinete Alves Silva, Jorge Timenetsky. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 604p. Título original: *Medical Microbiology*.

- Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 8. Ed. Washington: ASM press, 2003.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. Tradução de Eiler Fritsch Toros. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004: 762p. Título original: Medical Microbiology.
- Mussaffi H, FiremEM, Mei-Zahav M, Prais D, Blau H. Induced sputum in the very young* a new key to infection and inflammation. Chest www.chesjournal.org 2008; 133:1.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 5. Ed. Pennsylvania: NCCLS, 2000.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 9. Ed. Pennsylvania: NCCLS, 2004.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger princípios de bioquímica / Albert Lester. Tradução de Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 4° ed. São Paulo, 2006. 1202p. Título original: Lehninger Principles of Biochemistry.
- Neto Camargo E, Schulte J, Demari J, Lewis E. In: Meeting of the international society for neonatal “screening”. Book of Abstracts 1999; p. 90.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. Tradução de Paulo Armando Motta. 6° ed. Rio de Janeiro, 2002. 387. Título original: Thompson & Thompson Genetics in Medicin.
- Oliveira JP. Texto de Apoio Apostila Disciplina Genética Médica. Disponível em: URL: <http://users.med.up.pt/sdoria/genetica.htm>. 2004.
- Ordonez CL, Henig NR, Mayer-Hamblett N, Accurso FJ, Burns JL, Chmiel JF, et al. Inflammatory and microbiologic markers in induced sputum after intravenous antibiotics in cystic fibrosis Am J Respir Crit Care Med 2003; 168:1471-5.
- Orenstein DM. Cystic Fibrosis: a guide for patient and family. 2. Ed. Philadelphia: Lippincott 1996; p. 462.

Pellegrino CPLF. Integrons e cassetes de genes: elementos genéticos envolvidos com a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos carbapenemas. Rev Biomédico; 2004. 11:32-34.

Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J Bacterio, 1993:7363-7372.

Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 301: 421–422, 1983.

Quinton PM. Cystic fibrosis. Righting the wrong protein. Nature 347: 226, 1990a.

Quinton PM. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. FASEB J 4: 2709–2717, 1990b.

Quinton PM. Physiology. Disponível em: URL: <http://www.physiologyonline.org> 2007 V. 22:212-225.

Raskin S, Phillips JÁ, Kaplan G, McClure MC, Vinencak-Jones C, Rozov T, et al Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brasil. Hum Biol 1999; 71(1):111-121.

Raskin S. Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da Epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras. Curitiba, 2001. Tese. Universidade Federal do Paraná.

Ratjen F. New pumonary theraphies for cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med 2007; 13:541-46.

Ribeiro AF, Ribeiro JD, Ribeiro MA. Fibrose Cística (224). In: Lopes AC. Tratado de Clínica Médica. Volume II (ROCA). Rio de Janeiro: Editora ROCA; 2005.

Ribeiro CMP. The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. Drugs R D 2006; 7(1):17-31.

Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística do pediatra ao especialista. J Pediatr 2002, 2(78):171-186.

Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. Resposta dos autores à triagem neonatal de fibrose cística. *J Pediatr* 2003; 2(79): 193-194.

Riedi CA, Zavadniak AL, Silva DC, Franco A, Rosário Filho NA. Comparação da condutividade com a determinação de sódio na mesma amostra de suor. *J Pediatr* 2000; (76): 443-46.

Riordan JR. Identification of the cystic fibrosis gene. *Ed. Science* 1989; 245: 10566-73.

Robinson P. *Pseudomonas* cross-infection from Cystic Fibrosis patients to non-Cystic Fibrosis patients. Implications for inpatient care of respiratory patients. *J of Clin Microbiol* 2003; 12(41): 5741.

Rommens MJ. Identification of the cystic fibrosis gene II. *Ed. Science* 1989; p. 245: 1059-65.

Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, et al. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32:356-66.

Rosenfeld M, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin in Pulm Med* 2003; 9(6)492-97.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana – Interpretando o antibiograma. 1º Ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2005.

Rozov T. Doenças pulmonares em pediatria: diagnóstico e tratamento. 1º Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

Saiman L, Siegel J, and Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Infection Control Recommendations for Patients with Cystic Fibrosis: Microbiology, Important Pathogens, and Infection Control Practices to Prevent Patient-to-Patient Transmission. *Infection control and hospital epidemiology*, 2003; v.24(S5):S6-S52.

Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al. Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290:1749-56.

Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. Clin Microbiol Rev 2004; 1(17): 57-71.

Santana MA. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. Braz J Infec Dis, 2003; 7:69-72.

Santos FL, Santos IB, Assis ALM, Menezes LC. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, PB. J Bras Patol e Med Laborat, 2002; v. 38:79-84.

Santos GPC. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. J Pediatr 2005; 3(81):240-244.

Silva Filho LVF. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. Rev Med Trop S Paulo, 2002; 44:203-8.

Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC. Fisiologia Humana uma abordagem integrada. Tradução de Ivana Beatrice Mânica da Cruz. 2º ed. Baueri SP, 2003. 815p. Título original: Human Physiology: an integrated approach.

Smith AL, Doershuk C, Goldmann D, Gore E, Hilman B, Marks M, et al. Comparison of a beta-lactam alone *versus* beta-lactam and an aminoglycoside for pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. J Pediatr 1999; 134:413-21.

Souza HAPHM. Estudo da evolução da colonização bacteriana na fibrose cística com ênfase em *Staphylococcus aureus*. Curitiba, 2005. [Dissertação mestrado]. Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa*, PA01, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406:956-64.

Toporovski, MS. Fibrose cística. Rev Paul Pediatr 1995; 13(4): 115-119.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: an introduction. Texas: Add W Longman; 2003. 6º Ed.

- Trabulsi LR e Alterthum F. Microbiologia. São Paulo: Ed. Atheneu; 2005. 718p. 4ªed.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW et al. Cystic fibrosis *locus* defined a genetically linked polymorphic DNA marker. Science, 1985; v.230:1054-57.
- Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: 47-53.
- Unicamp. Laboratório de Patologia Clínica. Manual de Exames Laboratoriais HC/Unicamp Disponível em: URL: <http://www.hc.Unicamp.br/laboratorios/labpatologia.shtml>. 2005.
- van Ewijk BE, Zalm MM, Wofs TF, Enk CK. Viral respiratory infections in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2005; 4(Suppl):31-6.
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Pennsylvania.Ed. Wiley & Sons; 2006. 1596p. v.3.
- Wagner J, Santag M, Accurso FJ. Newborn “screening” for cystic fibrosis. Lippincott Williams & Wilkins, Inc 2003; 15(3): 309-15.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35:147-151.
- Wechsler R, Anção M, Campos C J R, Sigulem D. Computing in medical practice. JPediatr (RJ), 2006. Available from: <http://www.scielo.br/>.
- Welsh M, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The molecular and metabolic basis of inherited disease. New York. MacGraw-Hill 2001; 5121-88.
- West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok, Laxova A, Rock MJ. Respiratory Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in Children with Cystic Fibrosis - Early Detection by Serology and Assessment of Risk Factors. American Medical Association JAMA 2002; 287(22):2958-66.

Whittier S. Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous *Mycobacteria* in sputum samples from Cystic Fibrosis patients. J Clin Microbiol 1997; 10(35). p. 2706.

Wong K, Roberts MC, Owens L. Selective media for the quantitation of bacteria in Cystic Fibrosis sputum. J Med Microbiol 1984 17:113-119.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. Antimicrobio Agents Chemother, 2001; 45:2224-2228.

8- ANEXOS



CEP, 24/10/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 648/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0524.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS PACIENTES DE FIBROSE CÍSTICA DO HC UNICAMP: REGISTROS DE UMA DÉCADA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Liliam Machado Amalfi

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 20/10/2006

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/10/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Descrever os resultados arquivados eletronicamente de microbiologia, referente ao exame de CRD (cultura de róstina diagnóstica) dos pacientes atendidos no ambulatório de fibrose cística do HC/UNICAMP.

III - SUMÁRIO

Será feito um levantamento em banco de dados do período de fevereiro de 1994 a agosto de 2006, com relação ao teste de cultura microbiológica de escarro.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem elaborado. TCLE pode ser dispensado por tratar-se de estudo retrospectivo em banco de dados.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de outubro de 2006.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

De: Câmara de Pesquisa – Serviço de Estatística – FCM – Unicamp
Para: Liliam Machado Amalfi / Dr Antonio Fernando Ribeiro – Pediatria
Data: 18 de outubro de 2006.

Perfil microbiológico dos pacientes com fibrose cística no HC/Unicamp.

Objetivos:

1. Descrever o perfil microbiológico dos pacientes com fibrose cística, internados no HC/Unicamp, através de n=38.040 culturas de rotina diagnóstica (CRD's).
2. Analisar as relações de interesse entre determinadas variáveis, conforme os objetivos da pesquisadora.
3. Analisar a existência do efeito de tendência do percentual de resistência de um determinado microorganismo a uma determinada droga ao longo do período estudado.

Metodologia Estatística:

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (agentes etiológicos, faixas etárias, ...), com os valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), para cada microorganismo e cada droga utilizada.

Para analisar a associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste exato de Fisher (presença de valores esperados menores que 5).

Para analisar o efeito de tendência do percentual de resistência ao longo dos anos foi utilizada a Análise de Regressão Linear, e feito o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

De: Câmara de Pesquisa – Serviço de Estatística – FCM – Unicamp

Para: Liliam Machado Amalfi / Dr. Antonio Fernando Ribeiro – Pediatria

Data: 24 de novembro de 2006.

Perfil microbiológico dos pacientes com fibrose cística no HC/Unicamp.

Resultados (continuação – parte III):

Análise Descritiva Geral (revisada)

- a tabela 16, a seguir, apresenta as tabelas de frequência das variáveis para caracterização da amostra de estudo, após revisão, considerando apenas o 1º exame por data de cada paciente, totalizando n=975 exames (CRD) em n=100 pacientes.

Tabela 16- Análise descritiva das variáveis coletadas, amostra total (1997-2006), por CRD.

CRD / ANO DE COLETA			DESCRIÇÃO GERAL DOS RESULTADOS	
ANO	Frequency	Percent	(RESPOSTAS MÚLTIPLAS / PERCENTUAL CALCULADO SOBRE TOTAL DE CRD (n=975))	
1997	48	4.92		
1998	49	5.03		
1999	31	3.18		
2000	125	12.82		
2001	199	20.41		
2002	154	15.79		
2003	139	14.26		
2004	142	14.56		
2005	84	8.62		
2006	4	0.41		
IDADE (ANOS)			DESCRICAÇÃO	
IDADE	Frequency	Percent	Frequency	Percent
0-1	16	1.64	ALCALIGENES XYLOSOXIDANS	12 1.23
2-3	75	7.69	ASPERGILLUS FUMIGATUS	14 1.44
4-6	208	21.33	ASPERGILLUS SP	5 0.51
7-10	288	29.54	BRANHAMELLA CATARRALIS (MORAXELLA CATARRALIS)	2 0.21
11-14	177	18.15	BURKHOLDERIA (PSEUDOMONAS) CEPACIA	36 3.69
15-18	111	11.38	CANDIDA TROPICALIS	1 0.10
19-21	52	5.33	ESCHERICHIA COLI	1 0.10
22-25	25	2.56	HAEMOPHYLUS AEGYPTIUS	1 0.10
>25	23	2.36	HAEMOPHYLUS HAEMOLYTICUS	1 0.10
MATERIAL			HAEMOPHYLUS INFLUENZAE	151 15.49
MATERI	Frequency	Percent	HAEMOPHYLUS PARAINFLUENZAE	145 14.89
ESCARRO	567	58.15	HAEMOPHYLUS SP	3 0.31
SWAB	408	41.85	KLEBSIELLA OXYTOCA	1 0.10
			KLEBSIELLA PNEUMONIAE	21 2.15
			NEGATIVO	10 1.03
			NEISSERIA SICCA	2 0.21
			NEISSERIA SP	2 0.21
			OUTROS NÃO INCLUIDOS ESTUDO	57 5.85
			PSEUDOMONAS AERUGINOSA	420 43.08
			PSEUDOMONAS AERUGINOSA MUCÓIDE	369 37.85
			PSEUDOMONAS FLUORESCENS	2 0.21
			STAPHYLOCOCCUS AUREUS	489 50.15
			STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS	2 0.21
			STAPHYLOCOCCUS SP (COAGULASE NEG.)	91 9.33
			STREPTOCOCCUS GRUPO "MILLERI"	1 0.10
			STREPTOCOCCUS SP (GRUPO VIRIDANS)	5 0.51

PSEUDOMO	Frequency	Percent	SAUREUS	Frequency	Percent	KPNEUMON	Frequency	Percent
NÃO	423	43.38	NÃO	489	50.15	NÃO	954	97.85
SIM	552	56.62	SIM	486	49.85	SIM	21	2.15
PANAOMUC	Frequency	Percent	HINFLUEN	Frequency	Percent	AFUMIGAT	Frequency	Percent
NÃO	556	57.03	NÃO	686	70.36	NÃO	961	98.56
SIM	419	42.97	SIM	289	29.64	SIM	14	1.44
PAMUCOSA	Frequency	Percent	BCEPACIA	Frequency	Percent	AXYLOSOX	Frequency	Percent
NÃO	607	62.26	NÃO	939	96.31	NÃO	963	98.77
SIM	368	37.74	SIM	36	3.69	SIM	12	1.23

Análise Descritiva Geral por Paciente (revisada)

- seguir, apresenta as estatísticas descritivas das variáveis por paciente, após revisão dos dados.

Tabela 17- Análise descritiva das variáveis coletadas, por paciente.

<u>ANÁLISES DO 1º BANCO DE DADOS (N=975 CRD')</u>							ANO	Frequency	Percent	IDADE	Frequency	Percent
IDADE E NÚMERO DE CRD P/ PACIENTE							1997	31	31.00	0-1	12	12.00
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	1998	15	15.00	2-3	18	18.00
IDADE	100	10.15	8.46	0.00	9.00	46.0	1999	8	8.00	4-6	12	12.00
CRD	100	9.75	9.94	1.00	5.00	40.0	2000	14	14.00	7-10	17	17.00
							2001	7	7.00	11-14	14	14.00
							2002	4	4.00	15-18	13	13.00
							2004	1	1.00	19-21	4	4.00
							2005	18	18.00	22-25	5	5.00
							2006	2	2.00	>25	5	5.00
										CRDS	Frequency	Percent
										1-5	51	51.00
										6-10	9	9.00
										11-15	10	10.00
										16-20	13	13.00
										21-25	10	10.00
										26-30	4	4.00
										>30	3	3.00

Análise dos Principais Microrganismos

- as tabelas 18 e 19, a seguir, apresentam as tabelas de freqüência dos principais microrganismos, com as análises por ano de coleta e por faixa etária, para os n=975 CRD.

Tabela 18- Análise descritiva dos principais microrganismos, por ano de coleta do CRD.

ANO PSEUDOMO (PSEUDOMONAS AERUGINOSA)				ANO PANAOMUC (P A NÃO MUCÓIDE)				ANO PAMUCOSA (P A MUCÓIDE)									
Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total			
1997	16	32	48	33.33	66.67	1997	25	23	48	52.08	47.92	1997	28	20	48	58.33	41.67
1998	12	37	49	24.49	75.51	1998	14	35	49	28.57	71.43	1998	24	25	49	48.98	51.02
1999	8	23	31	25.81	74.19	1999	12	19	31	38.71	61.29	1999	13	18	31	41.94	58.06
2000	48	77	125	38.40	61.60	2000	65	60	125	52.00	48.00	2000	61	64	125	48.80	51.20
2001	102	97	199	51.26	48.74	2001	115	84	199	57.79	42.21	2001	128	71	199	64.32	35.68
2002	74	80	154	48.05	51.95	2002	90	64	154	58.44	41.56	2002	108	46	154	70.13	29.87
2003	65	74	139	46.76	53.24	2003	83	56	139	59.71	40.29	2003	107	32	139	76.98	23.02
2004	59	83	142	41.55	58.45	2004	97	45	142	68.31	31.69	2004	85	57	142	59.86	40.14
2005	38	46	84	45.24	54.76	2005	53	31	84	63.10	36.90	2005	52	32	84	61.90	38.10
2006	1	3	4	25.00	75.00	2006	2	2	4	50.00	50.00	2006	1	3	4	25.00	75.00
Total	423	552	975			Total	556	419	975			Total	607	368	975		
ANO SAUREUS STAPHYLOCOCCUS AUREUS				ANO HINFLUEN (H INFLUENZAE)				ANO BCPACIA BURKHOLDERIA CEPACIA									
Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total			
1997	19	29	48	39.58	60.42	1997	28	20	48	58.33	41.67	1997	47	1	48	97.92	2.08
1998	19	30	49	38.78	61.22	1998	33	16	49	67.35	32.65	1998	47	2	49	95.92	4.08
1999	12	19	31	38.71	61.29	1999	21	10	31	67.74	32.26	1999	31	0	31	100.00	0.00
2000	55	70	125	44.00	56.00	2000	76	49	125	60.80	39.20	2000	123	2	125	98.40	1.60
2001	89	110	199	44.72	55.28	2001	131	68	199	65.83	34.17	2001	197	2	199	98.99	1.01
2002	72	82	154	46.75	53.25	2002	92	62	154	59.74	40.26	2002	149	5	154	96.75	3.25
2003	87	52	139	62.59	37.41	2003	119	20	139	85.61	14.39	2003	124	15	139	89.21	10.79
2004	90	52	142	63.38	36.62	2004	125	17	142	88.03	11.97	2004	134	8	142	94.37	5.63
2005	45	39	84	53.57	46.43	2005	57	27	84	67.86	32.14	2005	83	1	84	98.81	1.19
2006	1	3	4	25.00	75.00	2006	4	0	4	100.00	0.00	2006	4	0	4	100.00	0.00
Total	489	486	975			Total	686	289	975			Total	939	36	975		

ANO KPNEUMON (<i>KLEBSIELA PNEUMONIAE</i>)				ANO AFUMIGAT <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>				ANO AXYLOSOX (A. XILOSOXIDANS)								
Frequency,	Row Pct	,NÃO	,SIM	Frequency,	Row Pct	,NÃO	,SIM	Frequency,	Row Pct	,NÃO	,SIM	Frequency,	Row Pct	,NÃO	,SIM	Total
1997	, 44	, 4	, 48	1997	, 48	, 0	, 48	1997	, 47	, 1	, 48	1997	, 47	, 1	, 48	
	, 91.67	, 8.33			, 100.00	, 0.00			, 97.92	, 2.08			, 97.92	, 2.08		
1998	, 48	, 1	, 49	1998	, 49	, 0	, 49	1998	, 48	, 1	, 49	1998	, 48	, 1	, 49	
	, 97.96	, 2.04			, 100.00	, 0.00			, 97.96	, 2.04			, 97.96	, 2.04		
1999	, 30	, 1	, 31	1999	, 31	, 0	, 31	1999	, 31	, 0	, 31	1999	, 31	, 0	, 31	
	, 96.77	, 3.23			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00		
2000	, 122	, 3	, 125	2000	, 120	, 5	, 125	2000	, 125	, 0	, 125	2000	, 125	, 0	, 125	
	, 97.60	, 2.40			, 96.00	, 4.00			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00		
2001	, 196	, 3	, 199	2001	, 196	, 3	, 199	2001	, 199	, 0	, 199	2001	, 199	, 0	, 199	
	, 98.49	, 1.51			, 98.49	, 1.51			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00		
2002	, 151	, 3	, 154	2002	, 151	, 3	, 154	2002	, 149	, 5	, 154	2002	, 149	, 5	, 154	
	, 98.05	, 1.95			, 98.05	, 1.95			, 96.75	, 3.25			, 96.75	, 3.25		
2003	, 135	, 4	, 139	2003	, 138	, 1	, 139	2003	, 136	, 3	, 139	2003	, 136	, 3	, 139	
	, 97.12	, 2.88			, 99.28	, 0.72			, 97.84	, 2.16			, 97.84	, 2.16		
2004	, 141	, 1	, 142	2004	, 140	, 2	, 142	2004	, 140	, 2	, 142	2004	, 140	, 2	, 142	
	, 99.30	, 0.70			, 98.59	, 1.41			, 98.59	, 1.41			, 98.59	, 1.41		
2005	, 83	, 1	, 84	2005	, 84	, 0	, 84	2005	, 84	, 0	, 84	2005	, 84	, 0	, 84	
	, 98.81	, 1.19			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00		
2006	, 4	, 0	, 4	2006	, 4	, 0	, 4	2006	, 4	, 0	, 4	2006	, 4	, 0	, 4	
	, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00			, 100.00	, 0.00		
Total	954	21	975	Total	961	14	975	Total	963	12	975	Total	963	12	975	

Tabela 19- Análise descritiva dos principais microrganismos, por faixa etária do CRD.

IDADE PSEUDOMO				IDADE PANAOMUC				IDADE PAMUCOSA						
Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total
0-1		7	9	16	0-1		7	9	16	0-1		12	4	16
		43.75	56.25				43.75	56.25				75.00	25.00	
2-3		35	40	75	2-3		37	38	75	2-3		51	24	75
		46.67	53.33				49.33	50.67				68.00	32.00	
4-6		80	128	208	4-6		102	106	208	4-6		128	80	208
		38.46	61.54				49.04	50.96				61.54	38.46	
7-10		136	152	288	7-10		165	123	288	7-10		198	90	288
		47.22	52.78				57.29	42.71				68.75	31.25	
11-14		75	102	177	11-14		104	73	177	11-14		102	75	177
		42.37	57.63				58.76	41.24				57.63	42.37	
15-18		58	53	111	15-18		79	32	111	15-18		66	45	111
		52.25	47.75				71.17	28.83				59.46	40.54	
19-21		26	26	52	19-21		34	18	52	19-21		34	18	52
		50.00	50.00				65.38	34.62				65.38	34.62	
22-25		3	22	25	22-25		12	13	25	22-25		9	16	25
		12.00	88.00				48.00	52.00				36.00	64.00	
>25		3	20	23	>25		16	7	23	>25		7	16	23
		13.04	86.96				69.57	30.43				30.43	69.57	
Total		423	552	975	Total		556	419	975	Total		607	368	975

IDADE SAUREUS				IDADE HINFLUEN				IDADE BCPACIA						
Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total
0-1		8	8	16	0-1		11	5	16	0-1		16	0	16
		50.00	50.00				68.75	31.25				100.00	0.00	
2-3		28	47	75	2-3		54	21	75	2-3		75	0	75
		37.33	62.67				72.00	28.00				100.00	0.00	
4-6		84	124	208	4-6		138	70	208	4-6		203	5	208
		40.38	59.62				66.35	33.65				97.60	2.40	
7-10		134	154	288	7-10		200	88	288	7-10		275	13	288
		46.53	53.47				69.44	30.56				95.49	4.51	
11-14		109	68	177	11-14		126	51	177	11-14		174	3	177
		61.58	38.42				71.19	28.81				98.31	1.69	
15-18		66	45	111	15-18		71	40	111	15-18		107	4	111
		59.46	40.54				63.96	36.04				96.40	3.60	
19-21		31	21	52	19-21		43	9	52	19-21		41	11	52
		59.62	40.38				82.69	17.31				78.85	21.15	
22-25		12	13	25	22-25		24	1	25	22-25		25	0	25
		48.00	52.00				96.00	4.00				100.00	0.00	
>25		17	6	23	>25		19	4	23	>25		23	0	23
		73.91	26.09				82.61	17.39				100.00	0.00	
Total		489	486	975	Total		686	289	975	Total		939	36	975

IDADE KPNEUMON				IDADE AFUMIGAT				IDADE AXYLOSOX						
Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total	Frequency,	Row Pct	NÃO	SIM	Total
0-1		12	4	16	0-1		16	0	16	0-1		16	0	16
		75.00	25.00				100.00	0.00				100.00	0.00	
2-3		70	5	75	2-3		75	0	75	2-3		75	0	75
		93.33	6.67				100.00	0.00				100.00	0.00	
4-6		205	3	208	4-6		207	1	208	4-6		204	4	208
		98.56	1.44				99.52	0.48				98.08	1.92	
7-10		281	7	288	7-10		283	5	288	7-10		285	3	288
		97.57	2.43				98.26	1.74				98.96	1.04	
11-14		177	0	177	11-14		177	0	177	11-14		177	0	177
		100.00	0.00				100.00	0.00				100.00	0.00	
15-18		109	2	111	15-18		108	3	111	15-18		106	5	111
		98.20	1.80				97.30	2.70				95.50	4.50	
19-21		52	0	52	19-21		48	4	52	19-21		52	0	52
		100.00	0.00				92.31	7.69				100.00	0.00	
22-25		25	0	25	22-25		25	0	25	22-25		25	0	25
		100.00	0.00				100.00	0.00				100.00	0.00	
>25		23	0	23	>25		22	1	23	>25		23	0	23
		100.00	0.00				95.65	4.35				100.00	0.00	
Total		954	21	975	Total		961	14	975	Total		963	12	975

Análise de Tendência da Freqüência de Microrganismos

- As tabelas acima foram utilizadas para apresentar os resultados das análises de tendência ou evolução da freqüência dos principais microrganismos no período de estudo por faixa etária, através da Análise de Regressão Linear e do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, visualizando os resultados através de gráficos de séries temporais ou tendência. (resultado destas tabelas estão inseridos nos resultados da dissertação)

9- APÊNDICES

CÓDIGOS: PARA COLETA DADOS PRONTUARIOS SAME HC/UNICAMP

CD	AGENTE ETIOLÓGICO	CD	ANTIBIÓTICO
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	Ampicilina
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	Ampicilina Sulbactam/ ou Sódica + Inibidor (02i)
3	<i>Pseudomonas aeruginosa (mucosa)</i>	3	Gentamicina
4	<i>Staphylococcus sp</i>	4	Ofloxacina/ Pe4 – Pefloxacina
5	<i>Neisseria sicca</i>	5	Ripampicina
6	<i>Streptococcus sp</i>	6	Sulfametaxazol + Trimetoprim
7	<i>Cândida Albicans</i>	7	Penicilina Cristalina
8	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	8	Cefazolina
9	<i>Klebsiela oxytoca</i>	9	Clindamicina
10	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	10	Nitrofurantoina
11	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	Oxacilina
12	<i>Aspergillus sp</i>	12	Tetraciclina
13	<i>Burkholderia cepacia</i>	13	Ciprofloxacina
14	<i>Haemophylus parainfluenzae</i>	14	Imipenem Clilast. Sódica
15	<i>Haemophylus influenzae</i>	15	Cefotaxina
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	16	Vancomicina
17	<i>Acinobacter baumanei</i>	17	Eritromicina
18	<i>Serratia marcescens</i>	18	Ticarciclina + Ac Clavulanico
19	<i>Neisseria sp</i>	19	Amicacina
20	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	20	Meropenem
21	<i>Stenotrophomonas (xanthomonas) maltophilia</i>	21	Ceftazidima
22	<i>Acinobacter lwoffii</i>	22	Cefepima
23	<i>Einkenella corrodens</i>	23	Netilmicina
24	<i>Kingella endologenes</i>	24	Tobramicina
25	<i>E.Coli</i>	25	Ceftriaxona
		26	Penicilina Benzatina
		27	Levo
		28	Pipe + Tazomicina
		29	Cloranfenicol
		30	Carbenicilina
		31	Teicomicina
		32	Amoxicilina clavulanato

** CORREÇÃO DAS PASTAS ATUALIZADAS DE TODOS OS PRONTUARIOS REVISTOS MÊS 01 E 02 DE 2007

N	COD PRT	OK	NOME	PI	V	PII	V	PIII	V	PI V	V	PV	V	OBS
1	381771-9	OK	FAC	K	ok	A	ok	-	-	-	-	-	-	completo
2	292792-9	OK	HB	K	ok	F*	ok	-	-	-	-	-	-	completo
3	375532-1	OK	DC	K	ok	F*	ok	-	-	-	-	-	-	completo
4	559592-1	OK	MB	K	ok	A	ok	A	ok	A	ok			completo
5	658672-9	OK	VA	△	ok	F	-	-	-	-	-	-	-	completo
6	144763-3	OK	TP	K	ok	K	?	A	ok	A	ok	-	-	completo
7	446424-0	OK	WP	K	ok	A	ok	-	-	-	-	-	-	completo
8	172255-6	OK	JA	A	ok	A	ok	-	-	-	-	-	-	completo
9	525336-3	Ñ	TB	A	ñ-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ñ achou
10	530586-3	Ñ	JS	A	ñ	A	ñ	-	-	-	-			Ñ achou
11	408307-8	D	PS	S	ñ	S	K	ok	K	ñ	K	ñ	O	Devolvido
12	591379-3	OK	DA	A	ok	△	ok	△	ok	-	-	-	-	completo
13		OK	THA	A	ok									completo

F-FORA (PEDIDO EM SOUZAS); K-CAGEDI (PEDIDO); A-ATIVO; △SII- S.A.II (SEGUNDO ANDAR – PEDIDO) O – OBITO; D-DEVOLUÇÃO POR FALTA DE PASTAS COMPLETAS

