

ISSN 2448-3877



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

SUPLEMENTO ESPECIAL DE MICROBIOLOGIA E MICOLOGIA

Volume 48 - Número 03 | Supl. 01 | Ano 2016

RBAC
Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses
Sumário/Contents

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW

- 04** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente
Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): an emerging resistance mechanism
Zanol FM, Cantarelli VV
- 10** Diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus* sp. no líquido
Laboratory diagnosis of Cryptococcus sp. in cerebrospinal fluid
Backes P, Santos JI, Borsatto EM, Reis M

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO/UPDATE

- 15** Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de tratamento intensivo: uma revisão
Occurrence of Pseudomonas aeruginosa in intensive care unit: a review
Colares KT, Andrade AF, Athayde LA

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 20** Estreptococos β -hemolíticos do grupo B em gestantes
Streptococcal beta-hemolytic group B in pregnant women
Campos RC, Lima GAFM, Eliane Picolli E
- 26** Ocorrência de enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido em isolados clínicos no sul do Brasil
Occurrence of extended spectrum β -lactamases producing enterobacteria in clinical isolates in south of Brazil
Lago A, Fuentesria SR, Fuentesria DB
- 32** Avaliação de portadores assintomáticos de *Salmonella* em manipuladores de alimentos
Evaluation of asymptomatic Salmonella carriers in food handlers
Rezende C, Fontana EA, Freitas AC, Colletes JH
- 36** Procalcitonina: uma nova ferramenta para o diagnóstico precoce e manejo da sepse - um estudo de casos em uma unidade de terapia intensiva
Procalcitonin: a new tool for early diagnosis and management of sepsis - a case study in intensive care unit
Oliveira AG, Diogo PHJ, Silva KM, Batista RIS, Silveira DTM, El Chaer WK, Soares KS, El Chaer GMS
- 41** Infecção urinária nosocomial no Hospital Universitário de Sergipe
Nosocomial urinary infection at University Hospital of Sergipe
Andrade RHS, Araújo JG
- 48** Diversidade microbiológica e suscetibilidade em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica diagnosticadas em Ponta Grossa, Paraná
Microbiological diversity and susceptibility in uropathogenic Escherichia coli strains diagnosed in Ponta Grossa, Paraná
Esmerino LA
- 55** Avaliação microbiológica de hemocomponentes
Microbiological evaluation of blood products
Cipriano AS, Nascimento FB, Borges GC
- 59** Contaminação de superfícies inanimadas de UTI por bactérias Gram negativas multirresistentes em hospital universitário de Goiânia, GO
Contamination of ICU inanimate surfaces by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in university hospital of Goiânia, GO
Cardoso AM, Reis C
- 66** Microrganismos do ar e infecção hospitalar
Air microorganisms and hospital infection
Feltrin C, Alves BC, Pasa TB, Silva MA

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 73** Avaliação de resíduos de antimicrobianos em leite UHT adquiridos no comércio de São José do Rio Preto
Evaluation of antibiotic residues in UHT milk commercialized in São José do Rio Preto
Furini AA, de Oliveira JC, Souza RS, Leão GM, Simões GS, Momesso CA
- 77** Atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)
Antimicrobial activity and phytochemical study of Schinopsis brasiliensis Engl. (Anacardiaceae)
Saraiva AM, Saraiva CL, Gonçalves AM, Xavier HS, Piscottano MN
- 83** Caracterização dos pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Campina Grande, Paraíba, no período de 2001 a 2008
Characterization of patients diagnosed with Hansen's Disease at the Campina Grande city, Paraíba, in the period of 2001 to 2008
Garcia AC, Freitas e Silva PM, Queiroz MS, Santiago EM, Melo TR
- 89** Pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes submetidos à aspiração endotraqueal
Ventilator-associated pneumonia in patients undergoing endotracheal suctioning
Santos GG, Silva BB
- 92** Prevalência e perfil de resistência bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes ambulatoriais da Grande Porto Alegre, RS
Bacterial prevalence and resistance profile in urinary tract infections of outpatients from metropolitan region of Porto Alegre, RS
Nunes PR, Fonini LS, Oliveira MS, Katagiri SK
- 98** Cultura de vigilância de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) em pacientes de unidades de terapia intensiva de um hospital terciário do norte do Rio Grande do Sul, Brasil
Culture surveillance enterobacteria resistant to carbapenems (ERC) in patients in intensive care unit of a tertiary hospital in northern Rio Grande do Sul, Brazil
Fiorentin CE, Fuentefria DB
- 103** Bactérias anaeróbias em processos infecciosos: ocorrência e significado clínico
Anaerobic bacteria in infectious processes: occurrence and clinical significance
Paiva M, Cogo LL, Kussen GMB, Lima MEM, Souza HAPH, Rosa AR, Rubel R
- 109** Morfotipagem de leveduras isoladas de secreção vaginal preservadas sob óleo mineral na micoteca URM
Morphotyping of yeasts isolated from vaginal secretions preserved under mineral oil in the micoteca URM
Gomes BS, Lima AN, Motta CMS, Giampaoli V, Porto ALF

COMUNICAÇÃO BREVE/SHORT COMMUNICATION

- 117** A quantidade de material placentário para diagnóstico microbiológico de listeriose humana é o fator limitante no diagnóstico?
Is the placental material for human listeriosis microbiological diagnosis the limiting factor for diagnosis?
Deliberalli I, Cunha-Schiavon V, Souza-Masiero F, Jannke HA, Santos AM, Blum-Menezes D

120 INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

Brazilian Journal of Clinical Analyses

Editor-chefe/Editor-in-Chief

Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Editores Eméritos/Honorary Editors

Mateus Mandu de Souza (RJ)

Editores Associados/Associate Editors

Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Paulo Jaconi Saraiva (RS)

Lauro Santos Filho (PB)

Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC

Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses

Edição online - Suplemento Especial de Microbiologia e Micologia

ISSN 2448-3877

Produção Editorial/Publisher

Trasso Comunicação Ltda

www.trasso.com.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

DIRETORIA EXECUTIVA/ EXECUTIVE BOARD

Jerolino Lopes Aquino (MT)

Presidente/President

Maria Elizabeth Menezes (SC)

Vice-Presidente/Vice-President

Jairo Epaminondas Breder Rocha (RJ)

(in memoriam)

Secretário-Geral/General Secretary

Luiz Roberto dos Santos Carvalho (BA)

Secretário/Secretary

Estevão José Colnago (RJ)

Tesoureiro/Treasurer

Marcos Kneip Fleury (RJ)

Tesoureiro Adjunto/Assistant Treasurer

Conselho Fiscal/Fiscal Board

Titulares / Holders

Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Maria da Conceição de L. Oliveira (SE)

Lenira da Silva Costa (RN)

Suplentes/Alternates

Gilcilene Maria dos Santos (DF)

Jorge Luiz Joaquim Terrão (ES)

Paulo Roberto Hatschbach (PR)

Diretor Executivo/ Director Executive

Luiz Fernando Barcelos (RS)

Endereço para correspondência/Editorial Office

Rua Vicente Licínio, 99 Tijuca - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

20270-902 - Fone: 21 2187-0800 - Fax: 21 2187-0805

E-mail: rbac@sbac.org.br

Afiliações/Affiliations



Comitê Editorial/Editorial Board

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Arício Treitinger (SC), Paolo Mocarrelli (ITA), Dulcinea Saes Parra Abdalla (SP), Ary Henrique Filho (GO), Daniel Mazziota (AR), Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Marinez Oliveira Sousa (MG), José Edson P. da Silva (RS), Rafael Noal Maresco (RS)

Citologia Clínica/Clinical Cytology

Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luís Fernando Barcelos (RS), Mateus Mandu de Souza (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

Endocrinologia/Endocrinology

Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia/Toxicology

Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology

Antônio Márcio Lopes (MG), Raimundo Diogo Machado (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simonetti (RS), Cássia Maria Zoccolli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

Imunologia Clínica/Clinical Immunology

Mateus Mandu de Souza (RJ), Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Adelaide José Vaz (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Geraldo Atilio de Carli (RS), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Micologia Clínica/Clinical Micrology

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

Biologia Molecular/Molecular Biology

Mario Hiroyuki Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávilla Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

Hematologia Clínica/Clinical Hematology

Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Celso Spada (SC), Paulo César Naoum (SP), Julio Cezar Merlin (PR), Paulo Henrique da Silva (PR), Robson Ferreira Ferraz Santos (RJ), José Edson Paz da Silva (RS)

Entidades mantidas pela SBAC Entities maintained by the SBAC

PNCQ - Programa Nacional de Controle de Qualidade/National Program of Quality Control

Coordenador/Coordinator: Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

DICQ Sistema Nacional de Acreditação/ National System of Accreditation

Coordenador/Coordinator: André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

CEPAC - Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas Post Graduation Center

Coordenadora/Coordinator: Maria Elizabeth Menezes (SC)

CB-36 - ABNT

Superintendente/Superintendent:
Humberto Marques Tiburcio (MG)

CSM-20

Coordenador Técnico/Technical Coordinator:
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissões Institucionais/ Institutional Commissions

Coordenador Geral/General Coordinator:

Jerolino Lopes Aquino (MT)

Comissão de Congressos/Congress Commission:

Coordenador Geral de Congressos/
General Congress Coordinator: Irineu K. Grinberg (RS)
Assessoria Científica/Scientific Advice:
Jerolino Lopes Aquino (MT); Luiz Fernando Barcelos (RS),
Marcos Kneip Fleury (RJ)

Normas e Habilitação/Norms and Qualification:

Coordenação/Coordination:
Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)
Membros/Members: Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Willy Carlos Jung (SC)

Ensino/Education:

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ)

Ética/Ethics:

Henrique Tommasi Netto (ES), Francisco Einstein do Nascimento (CE), Maria da Conceição L. Oliveira (SE)

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): an emerging resistance mechanism

Franciele Maria Zanol¹

Vladimir Vicente Cantarelli²

Resumo

O surgimento de infecções nosocomiais provocadas por patógenos multirresistentes tem emergido, causando grande preocupação. Entre os principais mecanismos de resistência desenvolvidos por microrganismos destaca-se a produção de enzimas que degradam antibióticos, como é o caso de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Trata-se de uma enzima pertencente à classificação A de Ambler, sendo amplamente distribuída e frequente em países da América do Norte. A expressão desta enzima em enterobactérias resulta na inativação de penicilinas, cefalosporinas e carbapenens, restringindo as opções terapêuticas. O diagnóstico laboratorial é baseado em métodos fenotípicos e moleculares, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) um importante método de detecção do gene de resistência.

Palavras-chave

Carbapenemases; KPC; Resistência bacteriana

INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais e comunitárias são causadas por uma variedade de microrganismos, sendo as bactérias um dos mais importantes agentes etiológicos associados a estas infecções.⁽¹⁾

Entre os principais microrganismos causadores de infecções hospitalares e que apresentam importantes mecanismos de resistência a antimicrobianos podem-se destacar bacilos Gram negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como é o caso de *Klebsiella pneumoniae*.⁽¹⁾

Trata-se de um microrganismo frequentemente associado a infecções do trato urinário, sendo responsável por casos de meningites, pneumonia e sepses desenvolvidas por pacientes hospitalizados.^(2,3) Esse patógeno é capaz de apresentar diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, sendo um dos principais a produção de enzimas capazes de degradar diferentes classes de fármacos. Entre as enzimas secretadas por *K. pneumoniae* destacam-se a AmpC, capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas até terceira geração e monobactâmicos, e podendo ser expressa a nível cromossomal ou plasmidial; as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL), responsáveis pela resistência deste microrganismo a penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos; e as carbapenemases.⁽⁴⁾

Os carbapenêmicos correspondem à classe de antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções provocadas por cepas resistentes a penicilinas e cefalosporinas de última geração.^(5,6) Seu uso, no entanto, deve ser controlado, pois esses agentes induzem a produção de AmpC, que pode estar associada com a perda ou expressão reduzida de proteínas chamadas porinas ou a superprodução de bombas de efluxo e a produção de carbapenemases.⁽⁷⁾

Cepas resistentes a carbapenêmicos já foram reportadas em diferentes continentes e diversos são os mecanismos envolvidos na resistência de patógenos a esta classe de fármacos, dentre eles a produção de enzimas.⁽⁴⁾

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma enzima produzida por enterobactérias capaz de inativar carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos.⁽⁸⁾ Os genes que codificam KPC estão localizados em plasmídios, elementos móveis que conferem mobilidade ao gene e asseguram sua rápida disseminação, fato que gera grande preocupação.⁽¹⁾

O diagnóstico laboratorial é baseado em metodologias fenotípicas que englobam testes como o disco-difusão, E-test e teste de Hodg-modificado. O rastreamento do gene *bla*_{KPC} pode ser feito também usando-se métodos moleculares, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).^(9,10)

¹Biomédica e aluna do curso de Especialização em Microbiologia Clínica semipresencial – Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

²Docente Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Patógenos que se apresentam resistentes vêm sendo observados desde a introdução, na prática clínica, dos primeiros agentes antimicrobianos. No entanto, a rápida disseminação destes microrganismos pode representar uma séria ameaça, considerando fatores já existentes como as altas taxas de mortalidade, restrição de tratamentos e a alta prevalência destes patógenos em ambientes hospitalares.

Neste contexto, torna-se necessária a pesquisa de KPC a fim de se evitar sua disseminação e diminuir as taxas de mortalidade resultantes de infecções causadas por patógenos multirresistentes.

CLASSIFICAÇÃO DAS CARBAPENEMASES

As carbapenemases são enzimas que apresentam capacidade de hidrolisar uma grande variedade de beta-lactâmicos, podendo ser classificadas como metalo-beta-lactamases, serino-carbapenemases e oxacilinasas de espectro estendido.⁽¹¹⁾

As metalo-beta-lactamases são enzimas pertencentes à classe B de Ambler ou grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros, consideradas metalo-enzimas e capazes de hidrolisar grande parte dos agentes beta-lactâmicos comercialmente disponíveis, tornando-os inativos. Essas metalo-enzimas hidrolisam o anel beta-lactâmico por meio de hidroxilação irreversível do grupo amida, causando inativação de antimicrobianos, que incluem cefalosporinas, carbapenens (imipenem e meropenem) e penicilinas, sendo a única exceção o monobactam aztreonam. Atuam também sobre os inibidores de serino beta-lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.⁽¹²⁾

Essa enzima compreende diferentes subclasses e, entre elas, estão a IMP (Imipenemase) e VIM (Verona Imipenemase), reportadas em Enterobactérias. A enzima IMP foi inicialmente detectada em 1994, em um isolado clínico de *Serratia marsecens* no Japão.⁽¹³⁾ Durante muitos anos, a detecção de isolados produtores de IMP-1 era restrita a este país, mas, atualmente, a IMP-1 tem sido isolada em diversas regiões e em diferentes microrganismos, como *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae*.⁽¹⁾

As oxacilinasas (OXA) pertencem à classificação D de Ambler e ao grupo 2d de Bush-Jacoby-Medeiros e são enzimas capazes de hidrolisar cloxacilina (oxacilina), conferindo resistência também a penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. São levemente inibidas pelo ácido clavulânico e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e apresentam mais de 120 variantes, das quais 45 apresentam capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e, por isso, são denominadas OXA-carbapenemases.^(14,15)

As OXA-carbapenemases não são encontradas com frequência em enterobactérias, sendo mais comuns em isolados de *A. baumannii*. No entanto, a variante OXA-48 já foi identificada em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia e, recentemente, no Líbano e na Bélgica.^(14,16)

As serino beta-lactamases são enzimas pertencentes à classe molecular A de Ambler e 2f de Bush-Jacoby-Medeiros, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam. Necessitam de uma serina na posição 70 do seu sítio ativo para exercerem sua atividade hidrolítica, que é inibida por ácido clavulânico e tazobactam.⁽¹⁾

Essas serino beta-lactamases de classe A já foram descritas em *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella* spp. e apresentam três grandes famílias: NMC/IMI, SME e KPC-1.

As carbapenemases NMC/IMI e SME apresentam genes cromossomais que conferem um perfil de resistência a carbapenens e podem ser induzidas em resposta ao uso de cefoxitina e imipenem. Devido à localização de seus genes, essas enzimas apresentam baixa prevalência e já foram encontradas em isolados de *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*.⁽¹⁾

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é a serino beta-lactamase de maior importância por apresentar genes localizados em plasmídios, o que confere sua rápida disseminação.⁽¹⁷⁾ Trata-se de enzimas classificadas em KPC-1 a KPC-9 com base em estudos moleculares e que apresentam capacidade de hidrolisar grande parte dos beta-lactâmicos comercialmente disponíveis.⁽¹⁸⁾

Klebsiella pneumoniae carbapenemase

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma enzima produzida por enterobactérias capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e monobactâmicos, sendo inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.⁽⁸⁾ Trata-se de uma enzima pertencente à classe molecular A de Ambler e ao grupo 2 de Bush, Jacob e Medeiros⁽¹⁾ e classificadas em KPC-1 a KPC-9, com base em estudos moleculares.⁽¹⁸⁾

Essa enzima confere sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos; a resistência completa a esta classe de antimicrobianos deve estar associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa bacteriana.⁽¹¹⁾

Por estarem localizados em plasmídios, os genes que codificam KPC são amplamente distribuídos e garantem a rápida disseminação deste mecanismo de resistência.⁽¹⁾

Grande parte das infecções causadas por enterobactérias produtoras de KPC são sistêmicas e frequentemente acometem pacientes com infecções do trato respi-

ratório ou com infecções urinárias associadas ao uso de cateteres, principalmente quando os pacientes apresentam sistema imunodeprimido.⁽¹¹⁾

A KPC já foi reportada em diferentes microrganismos, sendo mais prevalente em *Enterobacteriaceae* e identificada em isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *S. marcescens* e *Proteus mirabilis*.⁽¹⁹⁾

O relato da primeira KPC foi proveniente de um isolado de *K. pneumoniae*, em 2001, nos Estados Unidos, sendo classificada como KPC-1; posteriormente foi identificada a KPC-2 em isolados de *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* sp.⁽²⁰⁾

Três novas variantes foram identificadas a partir de mutações no gene estrutural da enzima KPC-2: *bla*_{KPC3}, *bla*_{KPC4} e *bla*_{KPC5}.^(21,22) A enzima KPC-3 foi inicialmente isolada em 2001, em Nova York, e tem sido identificada em cepas de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.⁽²³⁾ Essa enzima, assim como a KPC-2, é capaz de hidrolisar cefalotina e cefaloridina, mas é menos eficaz na hidrólise de cefotaxima e carbapenêmicos.⁽²⁴⁾ Já as enzimas KPC-4 e KPC-5 apresentam grande capacidade de hidrolisar ceftazidima, sendo eficientemente inibidas pelo ácido clavulânico; entretanto, apresentam menor capacidade de hidrolisar carbapenêmicos quando comparadas com a KPC-2. A variante KPC-4 foi encontrada em isolados de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e a KPC-5 foi inicialmente reportada em cepas de *P. aeruginosa*.⁽²²⁾

Quatro novas variantes foram identificadas recentemente; trata-se de KPC-6, 7 e 8, isoladas de *K. pneumoniae*, e KPC-9, encontrada em *E. coli*. Todas as variantes foram identificadas em Porto Rico, com exceção das enzimas KPC-7 e KPC-9.⁽¹⁸⁾

De modo geral, essa enzima, que era inicialmente restrita aos Estados Unidos, já foi reportada em diferentes países do mundo, como China, Colômbia, Grécia, Israel, Itália, Canadá, França e Brasil.⁽²⁵⁾

De acordo com dados do SENTRY correspondentes a 2000 e 2005, a América do Norte é a região com maior prevalência de serino carbapenemases.⁽⁷⁾ Estudos realizados demonstraram a alta prevalência desta enzima nos Estados Unidos, principalmente em Nova York, onde 24% dos isolados de *K. pneumoniae* eram produtores de KPC em um determinado período.⁽²⁶⁾

Na América Latina, as serino carbapenemases reportadas correspondem a uma das enzimas que apresentam maior diversidade.⁽¹⁵⁾

No Brasil já foram identificadas variantes desta enzima nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Pernambuco, o que comprova a ampla capacidade de disseminação desta bactéria.⁽²⁷⁾ O primeiro caso de KPC reportado no país foi em 2009, sendo detectada no paciente a presença também da enzima ESBL.⁽²⁸⁾

DETECÇÃO DE KPC

As metodologias empregadas na detecção da enzima KPC englobam testes fenotípicos e moleculares.

Como métodos fenotípicos podem ser empregados os testes de Hodge-modificado, disco-difusão (Kirby-Bauer) e E-test; já as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e ribotipagem podem ser aplicadas na pesquisa do gene *bla*_{KPC}.^(9,10,29)

A partir de 2009, em virtude da grande disseminação deste mecanismo de resistência, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) passou a preconizar como metodologia fenotípica confirmatória o teste de Hodge-modificado para detecção de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases.⁽³⁰⁾

De acordo com o CLSI, este teste deve ser empregado a fim de confirmar a presença de KPC em isolados que apresentarem resistência a cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftazidima e/ou ceftriaxona) e sensibilidade diminuída a carbapenêmicos, em especial meropenem e ertapenem, nos testes de triagem realizados pelo método de disco-difusão.⁽³⁰⁾

É importante salientar que enterobactérias produtoras de KPC são capazes de expressar a enzima mesmo apresentando-se sensíveis ou como resistentes intermediárias a carbapenêmicos nos testes de disco-difusão. Portanto, é recomendado o teste de Hodge-modificado em cepas que apresentarem halos reduzidos pela metodologia de Kirby-Bauer.⁽³⁰⁾

O teste de Hodge-modificado consiste em semear isolados bacterianos suspeitos de produzir KPC, de acordo com normas do CLSI, e, no centro de uma placa de ágar Mueller Hinton, adicionar um disco de carbapenem, semeadando, ao redor do disco, estrias estreitas das amostras a serem testadas. O teste é considerado positivo quando houver um alargamento da área correspondente ao halo de inibição.⁽³⁰⁾

Dentre os carbapenêmicos de escolha para avaliar a sensibilidade destes antimicrobianos, destacam-se ertapenem e meropenem. O carbapenêmico imipenem apresenta sensibilidade e especificidade reduzidas, sendo a sua utilização menos indicada na realização de testes fenotípicos.⁽³⁰⁾

Algumas pesquisas avaliaram a eficácia dos discos de antimicrobianos utilizados em testes de disco-difusão e Hodge-modificado, verificando que o imipenem apresenta menor desempenho que os demais carbapenêmicos.⁽³⁰⁾

Estudos recentes apontam a alta sensibilidade do teste de Hodge-modificado na detecção da enzima KPC em isolados de *K. pneumoniae*.⁽²³⁾

Lolans e colaboradores demonstraram, em recente pesquisa, que 100% dos isolados positivos para o teste

de Hodge-modificado apresentavam a presença do gene blaKPC, identificado através de PCR.⁽³¹⁾

Resultados semelhantes foram encontrados por Anderson e colaboradores,⁽⁹⁾ onde diferentes testes fenotípicos para a detecção de KPC foram avaliados. Os autores demonstraram que o teste de Hodge-modificado corresponde ao teste de maior especificidade e sensibilidade (100%), confirmando a aplicabilidade eficaz do método como teste confirmatório desta enzima.

Em contrapartida, diversas pesquisas demonstram a baixa sensibilidade do teste na detecção desta enzima em outras espécies bacterianas. Diversos autores afirmam que este teste fenotípico deve ser utilizado somente para detecção de carbapenemases em isolados de *K. pneumoniae*, já que pode induzir a resultados falso-positivos que podem estar relacionados à presença de outras beta-lactamases, como a enzima AMPc.⁽²³⁾

Outra metodologia fenotípica que pode ser empregada na detecção de KPC é o teste de disco-difusão, utilizado a fim de verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pertencentes às classes de cefalosporinas e carbapenêmicos.⁽¹⁰⁾

Um importante reagente que auxilia na detecção de KPC por este método é o ácido borônico (BA). Sugere-se que o teste seja realizado utilizando-se dois discos de carbapenêmicos, um contendo ácido borônico e outro sem o reagente; são considerados positivos para a produção de KPC os isolados que apresentarem halo referente ao disco de antimicrobiano combinado com BA igual ou maior que 5 mm, em comparação com o disco de antimicrobiano sozinho.⁽³²⁾

O uso de BA como inibidor de beta-lactamases em testes de detecção fenotípica foi relatado pela primeira vez em 1983, atuando através da inibição reversível de enzimas pertencentes à classe C.⁽³³⁾ A partir desta data, diversos estudos utilizando este composto foram realizados, demonstrando que o BA tem sido considerado um inibidor específico de beta-lactamases.^(32,34)

Em um estudo realizado por Pasteran e colaboradores, foi evidenciado o uso de BA como inibidor de beta-lactamases por meio de teste fenotípico utilizando como substrato o imipenem. No presente estudo, uma carbapenemase KPC-2 proveniente de um isolado de *K. pneumoniae* foi inibida pelo uso do composto em questão.⁽³⁴⁾

Pesquisas realizadas posteriormente confirmaram os resultados obtidos por Pasternan e colaboradores,⁽³⁴⁾ relatando que o uso de BA combinado com o substrato imipenem é específico para a detecção de enzimas do tipo KPC.⁽³²⁾

Tsakris e colaboradores demonstraram elevada especificidade e sensibilidade para o teste que emprega ácido borônico quando este é aplicado em discos de cefepime, imipenem ou meropen. Além disso, evidencia-

ram a facilidade de execução e interpretação oferecidas pelo teste.⁽³²⁾

Apesar do teste de Hodge-modificado ser considerado um teste confirmatório, resultados falso-positivos podem aparecer. Portanto, são aconselháveis testes de biologia molecular, considerados padrão ouro para o diagnóstico de KPC.⁽²³⁾

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o melhor método para detecção da enzima KPC. Trata-se de uma técnica molecular baseada na detecção dos genes de resistência em bactérias produtoras desta enzima através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos baseados nas regiões conservadoras de cada gene.⁽¹¹⁾

Alguns laboratórios utilizam técnicas de hibridização para detectar genes específicos de carbapenemases; por meio deste método é possível identificar se o gene de resistência apresenta localização plasmidial ou cromossômica.⁽³¹⁾

Métodos moleculares são testes rápidos e extremamente precisos na detecção de beta-lactamases, permitindo a identificação específica da enzima presente. Constituem importantes métodos diagnósticos de KPC em amostras suspeitas, contribuindo para evitar a disseminação deste gene de resistência.⁽¹⁾

TRATAMENTO

O tratamento de infecções causadas por bactérias envolve diferentes classes de antimicrobianos, sendo o surgimento, cada vez mais frequente, de patógenos multirresistentes, uma questão que tem gerado grande preocupação entre a comunidade médica e científica. Os carbapenêmicos correspondem à classe de fármacos de escolha no tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram negativas resistentes a penicilinas e cefalosporinas de última geração, principalmente entre as espécies de enterobactérias que apresentam diferentes mecanismos associados, como expressão de enzimas que degradam beta-lactâmicos (AmpC) e produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).⁽²⁶⁾

No entanto, o surgimento de cepas resistentes a esta classe de antimicrobianos vem sendo cada vez mais frequente, gerando grande preocupação em virtude das altas taxas de mortalidade decorrentes da restrição terapêutica e rápida disseminação dos genes de resistência.⁽³⁶⁾

Infecções causadas por enterobactérias produtoras de KPC são de difícil tratamento, sendo a combinação de polimixina B, tigerciclina e amicacina uma das únicas opções terapêuticas, devendo ser usadas quando se apresentarem sensíveis na determinação da concentração inibitória mínima (CIM). É importante salientar que, além do elevado custo destes fármacos, a polimixina B é um

antimicrobiano que apresenta extrema toxicidade, devendo estar entre as últimas opções de tratamento a serem escolhidas.^(10,35,36)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O surgimento de mecanismos de resistência vem causando alerta para a necessidade de adoção de medidas eficazes que controlem a disseminação de patógenos multirresistentes. Para isso, torna-se necessária extrema cautela na prescrição e uso de antimicrobianos. O emprego de técnicas diagnósticas sensíveis e específicas para os diferentes fenótipos de resistência assume grande importância neste contexto.

A KPC é uma enzima de rápida disseminação, capaz de degradar praticamente todos os antimicrobianos beta-lactâmicos disponíveis e que tem se tornado frequente no âmbito hospitalar.

Portanto, é de extrema importância que laboratórios de microbiologia clínica façam a correta identificação de fenótipos de resistência, confirmando os possíveis mecanismos envolvidos em cepas que apresentam sensibilidade diminuída a classes de fármacos específicas, contribuindo, desta forma, para o controle da disseminação de patógenos resistentes.

Abstract

The emergence of nosocomial infections caused by multidrug-resistant pathogens has emerged, causing great concern. Among the key resistance mechanisms developed by microorganisms there is the production of enzymes that degrade antibiotics, such as Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC). This is an enzyme belonging to Ambler's group A, which is widely distributed and common in countries of North America. The expression of this enzyme in enteric bacteria results in the inactivation of penicillins, cephalosporins and carbapenems, limiting the therapeutic options. The recognition of this mechanism of resistance is based on phenotypic and molecular methods, and the polymerase chain reaction (PCR) an important method for detecting the resistance gene

Keywords

Carbapenemases; KPC; Bacterial resistance

REFERÊNCIAS

- Queenan AN, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-1. Queenan AN, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007 Jul;20(3):440-58.
- Chang MR, Carvalho NC, Oliveira AL, Moncada PM, Moraes BA, Asensi MD. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Braz J Infect Dis. 2003 Apr;7(2):149-60.
- Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Apr;50(4):1257-62.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1669-7.
- Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis. 2005 Aug 15;41 Suppl 4:S276-8.
- Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Feb;51(2):77-84.
- Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials tested against serine carbapenemase and metallo-B-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):570-3.
- Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, et al. Plasmid-mediated, carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates. J Antimicrob Chemother. 2003 Mar;51(3):711-4.
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2007 Aug;45(8):2723-5.
- Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med. 2005 Jun 27;165(12):1430-5.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemases producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009 Apr;9(4):228-36.
- Gupta V. Metallo beta lactamase in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species. Expert Opin Investig Drugs. 2008 Feb;17(2):131-43.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):306-25.
- Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol. 2007 Oct;2(5):501-12.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2007 Sep;60(3):470-82.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible Klebsiella pneumoniae strain from Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Sep;52(9):3463-4.
- Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of Klebsiella pneumoniae that produce blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis. 2010 Sep;16(9):1349-56.
- Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in Acinetobacter spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):1354-7.
- Manuel R, Shin GY, Farrag N, Holliman R. Endemic carbapenem-resistance Acinetobacter baumannii in a London Hospital. J Antimicrob Chemother. 2003 Jul;52(1):141-2.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing B-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):1151-61. Erratum in Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb; 52(2):809.
- Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extend-spectrum beta-lactamase in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004 Oct;54(4):735-43.
- Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evaluation variants, KPC-2 and KPC-4. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Feb;53(2):557-62.

23. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jun;52(6):2014-8.
24. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11): 4760-2.
25. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, Natoli S, Altieri A, Bossa MC, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Res Notes*. 2010 Feb 23;3:40.
26. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug;50(8):2880-2.
27. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb;63(2):265-8.
28. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):333-4.
29. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 1;39(1):55-60.
30. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Wayne, PA, USA, 2010.
31. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol*. 2010 Mar;48(3):836-41.
32. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk test for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47(2):362-7.
33. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem J*. 1983 Jan 1;209(1):229-3.
34. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening test for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6): 1631-9.
35. Livermore D. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep;64 Suppl 1:i29-36.
36. Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):890-7.

Correspondência

Franciele Maria Zanol

Rua Dr. Montauray 1441, sala 402 – Centro
95020-190 – Caxias do Sul, RS
E-mail: franciele.zanol@fsg.br

Diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus* sp. no líquido

Laboratory diagnosis of *Cryptococcus* sp. in cerebrospinal fluid

Patrícia Backes¹

Jairo Ivo dos Santos²

Elaine Maria Borsatto³

Marcellus Reis⁴

Resumo

A neurocriptococose é uma das formas clínicas mais comuns da infecção humana pelo *Cryptococcus*. Os métodos de diagnóstico da neurocriptococose incluem a pesquisa microscópica do *Cryptococcus* no líquido, o seu cultivo em meios nutricionais apropriados e a pesquisa imunológica do antígeno capsular desta levedura. Outros métodos, como atividade de urease, fenoloxidase, cultivo no meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), e detecção de DNA fúngico, também podem ser úteis na identificação dessa levedura. Entretanto, consensos que especifiquem detalhes minuciosos sobre as diferentes técnicas utilizadas no diagnóstico ainda são aguardados para que possam guiar o analista clínico em seus procedimentos laboratoriais rotineiros.

Palavras-chave

Neurocriptococose; *Cryptococcus*; Líquor; Diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* compreende várias espécies de leveduras, que comumente apresentam-se como células esféricas ou ovoides, medindo de 2,5 µm a 10 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo e são geralmente envoltas por uma cápsula de natureza mucopolissacarídica, com diâmetro variável de 1 µm a 30 µm, e que é de grande importância para a identificação do *Cryptococcus*.^(1,2)

Do ponto de vista médico, duas espécies são importantes, pela frequência com que causam criptococose: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Entretanto, outras espécies podem, embora raramente, causar infecção humana, como as espécies *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus curvatus*.^(1,3,4)

Manifestações neurológicas da criptococose

As lesões causadas pelo *Cryptococcus* ocorrem principalmente nos pulmões e sistema nervoso central. A rota da infecção por *Cryptococcus* começa nos pulmões, e partindo daí o fungo pode migrar para outras partes do corpo, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central, onde causa meningite, meningoencefalite e encefalite.⁽¹⁾

A afinidade do *Cryptococcus* pelo sistema nervoso central, provavelmente, se deve à alta concentração de nu-

trientes assimiláveis pelo fungo, à falta de atividade do sistema complemento e à fraca ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral. O cérebro é abundante em catecolaminas, que podem ser utilizadas pelo fungo para síntese de melanina.^(5,6) Além disso, as cepas de *Cryptococcus* podem sobreviver e multiplicar-se em ambientes com baixa tensão de O₂ e relativa alta tensão de CO₂ em temperaturas de 37 °C, como é observado no tecido cerebral.⁽⁷⁾

Na neurocriptococose, a forma clínica mais comum é a meningoencefalite, ocorrendo em mais de 80% dos casos, sob forma isolada ou associada com acometimento pulmonar. Com mais frequência apresenta-se como meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda, porém lesões focais únicas ou múltiplas no sistema nervoso central, simulando neoplasias, associadas ou não ao quadro de meningite podem ser encontradas no paciente não imunocompetentes.⁽⁴⁾ Nesses pacientes, a doença manifesta-se por náuseas, vômitos e rigidez na nuca. No quadro meningoencefálico, esses podem apresentar-se com alterações de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição; também estrabismo, paralisia facial e, às vezes, demência como única manifestação da doença.

Em pacientes imunodeprimidos, a meningoencefalite se manifesta de modo agudo, com mais frequência em pacientes do sexo masculino, com carga fúngica elevada, com ampla variação de sinais clínicos, mas pode também apresentar poucos sinais e sintomas. Cefaleia e febre

¹Aluna de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

²Professor Associado, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

³Farmacêutica-Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Farmacêutico-Bioquímico, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Universitário de Florianópolis – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

estão presentes em torno de 70% dos casos, e deve-se desconfiar de meningite criptocócica sempre que o paciente portador de HIV apresentar cefaleia e febre inexplicada, demência progressiva e confusão mental.^(1,6,8)

A neurocriptococose também pode se manifestar com duas outras características: pseudocitose gelatinosa e criptococoma. Na pseudocitose gelatinosa, o espaço perivascular dilatado se transforma em lesões císticas confluentes. No criptococoma, as lesões resultam de uma invasão direta do cérebro com uma reação granulomatosa e podem se desenvolver em indivíduos imunocompetentes.⁽⁹⁾

Métodos de diagnóstico laboratorial de *cryptococcus* no líquor

Os métodos laboratoriais mais utilizados para a detecção do *Cryptococcus* no líquor são: a pesquisa microscópica direta do fungo no sedimento da centrifugação do líquor, o seu cultivo em meios apropriados e a pesquisa imunológica do antígeno capsular.⁽¹⁾ Outros testes e meios nutricionais como detecção de atividade de urease e fenoloxidase, e cultivo meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) também podem ser úteis para diferenciar *Cryptococcus* de outros gêneros de leveduras, assim como diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.⁽¹⁾

Exame microscópico do líquor

Para a detecção de *Cryptococcus* no exame microscópico do líquor, utilizam-se diversos tipos de colorações, dos quais o mais utilizado é a coloração com tinta Nanquim (ou tinta da China). Ela permite a observação indireta da cápsula, já que a mesma vai se destacar contra um fundo negro. O teste da tinta da China identifica *Cryptococcus* em 60% a 80% dos casos de criptococose em pacientes com AIDS, e aproximadamente 50% dos casos de criptococose sem AIDS.^(4,10,11)

Tanner et al. verificaram que um alto número de elementos fúngicos na amostra é necessário para que possam ser detectados no exame microscópico direto.⁽¹²⁾ Assim, uma baixa quantidade de elementos fúngicos no líquor pode levar à ocorrência de resultados falso-negativos. Comparando-se os métodos de aglutinação entre si e com o método tinta da China, os autores observaram que 68% das amostras positivas verdadeiras eram realmente reagentes nesse teste. Observaram também que 95% das amostras de líquor, positivas no teste da tinta da China, apresentavam títulos altos de antígeno polissacarídico (acima de 1:256) em todos os kits comerciais em que foram testadas.⁽¹²⁾

Sato et al., ao compararem vários testes rápidos para detecção de *Cryptococcus* verificaram, em trinta cultivos positivos para *Cryptococcus*, que o teste com tinta da China mostrou-se sensível apenas para pouco mais de 50% das amostras, enquanto que o ensaio com o antígeno

criptocócico se mostrou sensível em mais de 90% dos casos.⁽¹³⁾

Formas atípicas de *Cryptococcus* encontradas no líquor, principalmente de pacientes com AIDS, já foram detectadas por meio do teste da tinta da China. Por exemplo, pseudo hifas capsuladas foram observadas em amostra líquórica de paciente com AIDS, decorrente da alta carga viral de HIV e baixo número de linfócitos T CD4. Esse estado de imunodepressão poderia ter induzido e facilitado ao fungo a capacidade de produzir pseudo hifas.⁽¹⁴⁾ Também cápsulas degeneradas do fungo puderam ser observadas, o que provavelmente pode ser devido ao tratamento do paciente com anfotericina B. A presença de formas atípicas de *C. neoformans* no líquor de pacientes com AIDS poderia ser interpretado como uma possível adaptação das células fúngicas ao meio.⁽¹⁴⁾

Cultura e isolamento do fungo

A cultura é o padrão-ouro de diagnóstico da criptococose, sendo considerada uma técnica sensível, específica e de baixo custo, embora haja divergências na literatura quanto à sua real sensibilidade e especificidade.⁽¹⁾

O *Cryptococcus* cresce bem em meios de cultura que não contenham cicloheximida, pois este age como um agente inibidor do crescimento para esta levedura. As colônias crescem geralmente após 48 horas de incubação, em temperaturas entre 28°-32°C. No isolamento de *Cryptococcus*, observam-se colônias com aparência mucóide e tonalidades de coloração creme ou acastanhada. A hemocultura pode revelar a presença de fungo no sangue em doença disseminada. Essa levedura também cresce bem em meios bacteriológicos, como agar sangue, agar chocolate, agar Tayer-Martin e agar BHI.⁽¹⁾

Apesar da cultura ser considerada padrão-ouro no diagnóstico de criptococose, os seus valores de especificidade e a sensibilidade podem variar bastante. As discordâncias observadas podem ser explicadas pela falta de padronização nos procedimentos laboratoriais, como centrifugação prévia da amostra e tamanho do inóculo.^(1,7) Em pacientes com AIDS, as culturas quase sempre são positivas devido ao alto número de elementos fúngicos. Já em pacientes sem AIDS, as culturas são positivas em 90% dos casos, podendo esse valor ser maior quando se utilizam inóculos maiores.⁽⁴⁾ Barenfanger et al. sugerem que a realização de cultura para finalidade de diagnóstico bacteriológico, junto com o teste de aglutinação em látex, já seriam suficientes para detectar a presença de *Cryptococcus* no líquor, sem necessidade de utilizar agar Sabouraud.⁽¹⁵⁾

Atividade de Urease

A urease é uma enzima que catalisa a conversão de ureia em amônio e carbamato. A detecção desta enzima na rotina laboratorial é utilizada para a diferenciação de

Cryptococcus (urease positiva) e *Candida* (urease negativa). Entretanto, espécies do gênero *Rhodotorula* e *Trichosporon* também podem apresentar atividade de urease. O meio utilizado é o agar Christensen ureia, que contém o indicador vermelho fenol em sua composição. Há produção de amônia, com conseqüente aumento de pH, levando à mudança da coloração do indicador de pH após algumas horas de incubação.⁽¹⁶⁾ Com relação a possíveis diferenças na expressão de atividade de urease entre as espécies de *Cryptococcus*, Torres-Rodríguez et al. verificaram que *C. neoformans* possui maior atividade de urease do que *C. gattii*, ao testarem 25 amostras de origem ambiental e de líquidos humanos infectados.⁽¹⁷⁾

Atividade de Fenoloxidase

Existem também meios nutricionais que indicam presença de atividade de fenoloxidase (lacase) em *C. neoformans* e *C. gattii*. Estas espécies de *Cryptococcus* são capazes de produzir melanina a partir de substratos fenólicos, presentes no ácido cafeico, dopamina e extrato de sementes de niger (*Guizotia abyssynica*), e o pigmento produzido confere às colônias uma cor marrom ou negra.^(18,19,20)

Agar canavanina-glicina-azul de bromotimol

O agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (meio CGB) foi proposto em 1982 para diferenciar as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. Apenas o *C. gattii* é resistente à canavanina e utiliza glicina como fonte de carbono e nitrogênio. É um método rápido e simples para a identificação das espécies, apesar de que, em alguns casos, ocorre crescimento de *C. neoformans* mesmo com altas concentrações de canavanina.⁽²¹⁻²⁴⁾

Teste de aglutinação em látex

Durante a infecção, o principal componente antigênico da cápsula, o glucuronoxylomanana (GXM), solubiliza-se nos fluidos corpóreos, possibilitando sua detecção através de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos. É considerado um teste muito sensível e específico (>90%) e é útil quando a pesquisa direta com tinta da China dá um resultado negativo.^(4,25)

Falsos resultados no teste de aglutinação em látex podem ocorrer, tanto no líquido quanto no soro. Uma das causas de resultado falso-positivo é a presença do fator reumatoide, mas que é eliminado pelo tratamento com pronase (agente proteolítico) contido nos kits comerciais. Outras de reações falso-positivas no líquido poderiam ser devido à exposição deste ao fluido sinerético (condensação da superfície) de placas de ágar chocolate, mesmo em concentrações muito baixas, e inativação da enzima pronase. Entretanto, isso poderia ser evitado ao se realizar o teste de detecção de antígeno no líquido cefalorraquidiano

antes de se fazer a cultura, e usar uma amostra separada para este procedimento. Também polissacarídeos de *Trichosporon* spp. e *Stomacoccus mucilaginosus* poderiam induzir uma reação cruzada, em caso de infecção disseminada por estes microrganismos.^(4,26-30)

No estudo de Tanner et al., em que compararam vários kits comerciais de aglutinação por látex, eles observaram que os testes comerciais que não incluíam a pronase na preparação do espécime tinham também as maiores taxas de falso-negativos, sendo que o tratamento com a pronase, nesses casos, eliminou esses casos. De fato, isso resultou em amostras positivas com altos títulos de aglutinação.⁽¹²⁾ As sensibilidades antes e depois do tratamento com a pronase foram de 83% e 97%, respectivamente, mostrando uma diferença significativa e que deve ser levada em consideração na escolha do kit. Por outro lado, o pré-tratamento com pronase parece não ser necessário quando se trata de amostras de líquido.⁽¹²⁾ Entretanto, não se exclui a possibilidade de que outras substâncias interferentes, que não proteínas presentes no líquido, se liguem ao reagente e produzam resultados falso-negativos.⁽³¹⁾

A causa mais comum da ocorrência de resultados falso-negativos para *Cryptococcus* é a existência de cepas acapsuladas.⁽³²⁾ Outras razões podem ser uma concentração de antígenos menor que o limite de detecção dos kits, ou de que a produção capsular do polissacarídeo *in vivo* poderia resultar em diferenças qualitativas na expressão de antígenos, o que, conseqüentemente, levaria a diferenças na detecção de diferentes kits. O efeito pró-zona também não deve ser descartado quando altos títulos de antígenos circulantes estão presentes.⁽³¹⁾

Resultados falso-negativos para a prova do látex em amostras de líquido podem retardar o diagnóstico e a terapia de pacientes com meningite criptocócica. Deve-se, portanto, assumir que a não positividade nos testes de aglutinação em látex não exclui o diagnóstico de neurocriptococose, particularmente quando apenas uma amostra de líquido de um paciente sintomático é enviada para análise. Sugere-se sempre proceder à cultura do fungo em toda e qualquer amostra de líquido que chegue ao laboratório, e que essas culturas sejam cuidadosamente observadas diariamente por até uma semana.⁽¹⁹⁾

Métodos de aglutinação e coaglutinação, assim como outros métodos comuns de diagnóstico, foram testados e comparados por Khyriem et al.⁽³³⁾ O sedimento do centrifugado foi utilizado para a microscopia direta e o sobrenadante para testes de detecção de antígeno. Antes da adição da tinta Nanquim, o sedimento era misturado com mercúrio-cromo a 2%. A cultura se mostrou sensível em apenas 25% dos casos, enquanto que a detecção do antígeno foi o método que mais sensibilidade apresentou (mais de 90%). A coaglutinação é um método modificado de detecção de antígenos, que o estudo de Khyriem et al.

demonstrou dentre outras técnicas analisadas, a maior sensibilidade. Nesta técnica, em vez de partículas inertes de látex, os autores utilizaram células de *Staphylococcus*, que propiciam uma melhor absorção do antissoro, obtido por inoculação de cepas padronizadas de *C. neoformans* em coelhos.⁽³³⁾

Teste de ELISA

O método de ELISA (ensaio imunoenzimático) é um teste relativamente rápido, barato, com alta sensibilidade e especificidade, utilizada para a detecção dos antígenos polissacarídicos da cápsula do *C. neoformans* no líquor. Além disso, esse teste não exige pré-tratamento da amostra, diferentemente do que ocorre com o teste de látex.^(12,34,35) Segundo Saha et al., o teste de ELISA apresenta vantagens sobre o teste de aglutinação em látex porque mostra um claro valor de corte entre amostras positivas e negativas.⁽³⁵⁾

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos vêm sendo desenvolvidos para a detecção de *Cryptococcus* em líquor e outros materiais biológicos como sangue, secreções, biópsias, aspirado broncoalveolar e urina.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾ O teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) apresenta-se como uma boa alternativa em questões de especificidade e sensibilidade, já que consiste no isolamento do ácido nucleico da levedura, amplificação deste por PCR e identificação do fungo pela comparação de bandas providas da eletroforese em gel de poliacrilamida ou gel de agarose.^(36,37,39,40) Variações no método de PCR também foram descritas, como, por exemplo, ensaio de PCR associado com enzima de restrição.⁽⁴¹⁾ Entretanto, a ampla utilização de procedimentos moleculares na identificação de *Cryptococcus* ainda é dificultada pela necessidade de altos investimentos devidos ao alto custo de equipamentos e reagentes, instalações físicas apropriadas e contratação de profissionais qualificados, assim como a necessidade de padronização dos procedimentos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento dos casos de neurocriptococose, essa micose sistêmica passou de status de doença pouco comum para uma das mais importantes e preocupantes infecções oportunistas que acometem os pacientes imunocomprometidos, o que tem levantado cada vez mais interesse de estudo quanto às características da doença e do fungo, e também sobre os métodos laboratoriais que podem ser utilizados para a detecção deste fungo no hospedeiro humano. Métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial, como o exame microscópico, o cultivo do fun-

go e a pesquisa do antígeno capsular permanecem como os métodos de escolha para o diagnóstico laboratorial das infecções por *Cryptococcus* no líquor. Por sua vez, o avanço de técnicas moleculares como o PCR também tem demonstrado que há possibilidade de identificação deste fungo em diversos tipos de amostras biológicas, inclusive o líquor. Portanto, várias são as metodologias para detecção do *Cryptococcus* utilizadas em um laboratório clínico. Para a escolha das técnicas a serem utilizadas deve ser levado em consideração a sua sensibilidade e especificidade, a fim de que um resultado fidedigno e confiável possa ser alcançado. A elaboração de consensos voltados à questão laboratorial e que especifiquem detalhes minuciosos sobre as técnicas, assim como valores reais e realmente confiáveis para sensibilidade e especificidade das mesmas, seriam extremamente úteis para guiar o analista clínico em seus procedimentos laboratoriais rotineiros.

Abstract

Neurocryptococcosis constitutes the most common clinical form of the human Cryptococcus infection. The laboratory methods for the diagnosis of neurocryptococcosis in cerebrospinal fluid (CSF) include microscopic study of the fungus in the CSF, its cultivation on suitable nutrient media and immunological detection of yeast capsular antigen. Other methods, such as urease and phenoloxidase activity, fungal cultivation in CGB medium (canavanine-glycine-bromothymol blue) and the detection of fungal DNA, may also be useful in the identification of this yeast. However, guidelines that specify full details of the different techniques used in diagnosis are still awaited so that they can guide the professional in its routine laboratory procedures.

Keywords

Neurocryptococcosis; Cryptococcus; Cerebrospinal fluid; Laboratory diagnosis

REFERÊNCIAS

1. Consenso em criptococose. Rev Soc Bras Med Trop., 41 (5): 524-544, 2008.
2. McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 2006 Nov;14(11):497-505.
3. Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidos* cryptococcaemia in AIDS patients. Med Mycol. 1998 Oct;36(5):335-9.
4. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS -100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct;8(4):515-48.
5. Rodrigues ML, Alviano CS, Travassos LR. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. Microbes Infect. 1999 Apr;1(4):293-301.
6. Severo LC, de Mattos Oliveira F, Londero AT. Criptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. Rev Iberoam Micol. 1999 Sep;16(3):152-4.
7. Bahn YS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Carbonic anhydrase and CO2 sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. Curr Biol. 2005 Nov 22;15(22):2013-20.
8. Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1989 Sep 21;321(12):794-9.

9. Rumboldt Z, Thurnher MM, Gupta RK. Central nervous system infections. *Semin Roentgenol.* 2007 Apr;42(2):62-91.
10. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen RA, Pankey GA, Lancaster DJ, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 1;33(5):690-9.
11. van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1997 Jul 3;337(1):15-21.
12. Tanner DC, Weinstein MP, Fedorciw B, Joho KL, Thorpe JJ, Reller L. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1994 Jul;32(7):1680-4.
13. Sato Y, Osabe S, Kuno H, Kaji M, Oizumi K. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci.* 1999 Mar 15;164(1):72-5.
14. Bava J, Solari R, Isla G, Troncoso A. Atypical forms of *Cryptococcus neoformans* in CSF of an AIDS patient. *J Infect Dev Ctries.* 2008 Oct 1;2(5):403-5.
15. Barenfanger J, Lawhorn J, Drake C. Non value of culturing cerebrospinal fluid for fungi. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):236-8.
16. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica Lacaz. São Paulo (SP): Sarvier, 2002. 1104 p.
- 17 Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, Gutiérrez-Gallego R. Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Rev Iberoam Micol.* 2008 Mar;25 (1):27-31. [Article in Spanish].
18. Hopper RL, Blank F. Caffeic acid-containing medium for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1976 Aug;2(2):115-20.
19. Ministério Da Saúde. Anvisa. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar em Serviços de Saúde. Brasília, 2004. 381p.
20. Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40 (5): 566-8.
21. Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia.* 2006 Feb;161(2):83-91.
22. Kwon-Chung KJ, Polachek I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol.* 1982 Mar; 15(3):535-7.
23. Nakamura Y1, Kano R, Sato H, Watanabe S, Takahashi H, Hasegawa A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromothymol blue medium. *Mycoses.* 1998 Jan-Feb;41(1-2):35-40.
24. Nishikawa MM, Sant'Anna OD, Lazera MS, Wanke B. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J Med Vet Mycol.* 1996 Sep-Oct;34(5):365-6.
25. Snow RM, Dismukes WE. Cryptococcal meningitis: diagnostic value of cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid. *Arch Intern Med.* 1975 Sep;135(9):1155-7.
26. Engler HD, Shea YR. Effect of potential interference factors on performance of enzyme immunoassay and latex agglutination assay for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1994 Sep;32(9):2307-8.
27. Hamilton JR, Noble A, Denning DW, Stevens DA. Performance of *Cryptococcus* antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after pronase treatment. *J Clin Microbiol.* 1991 Feb;29(2):333-9.
28. Heelan JS, Corpus L, Kessimian N. False-positive reactions in the latex agglutination test for *Cryptococcus neoformans* antigen. *J Clin Microbiol.* 1991 Jun;29(6):1260-1.
29. Sax PE. Opportunistic infections in HIV disease: down but not out. *Infect Dis Clin North Am.* 2001 Jun;15(2):433-55.
30. Stoeckli TC, Burman WJ. Inactivated pronase as the cause of false-positive results of serum cryptococcal antigen tests. *Clin Infect Dis.* 2001 Mar 1;32(5):836-7.
31. Currie BP, Freundlich LF, Soto MA, Casadevall A... False-negative cerebrospinal fluid cryptococcal latex agglutination tests for patients with culture-positive cryptococcal meningitis. *J Clin Microbiol.* 1993 Sep;31(9):2519-22.
32. Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Moreno-Carvalho OA, Sampaio ML, Nogueira LS, et al. Neurocryptococcosis caused by nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Arq Neuropsiquiatr.* 1993 Sep;51(3):395-8. [Article in Portuguese].
33. Khyriem AB, Sujatha S, Das AK, Parija SC. Comparison of latex agglutination and co-agglutination for the diagnosis and prognosis of Cryptococcal meningitis. *Indian J Med Microbiol.* 2003 Oct-Dec;21(4):252-6.
34. Gade W, Hinnefeld SW, Babcock LS, Gilligan P, Kelly W, Wait K, et al. Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J Clin Microbiol.* 1991 Aug;29(8):1616-9.
35. Saha DC1, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J Med Microbiol.* 2009 Aug;58(Pt 8): 1098-105.
36. Bialek R, Weiss M, Bekure-Nemariam K, Najvar LK, Alberdi MB, Graybill JR, Reischl U. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real-time PCR assays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Mar;9(2):461-9.
37. Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem Mde S, Dias AL, Paula CR. Neurocryptococcosis diagnosis by PCR method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004 Jul-Aug;46(4):203-7.
38. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol.* 1995 Nov;33 (11): 2913-9.
39. Sidrim JJ, Costa AK, Cordeiro RA, Brilhante RS, Moura FE, Castelo-Branco DS, et al. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol.* 2010 Jun;56(6):445-58.
40. Veron V, Simon S, Blanchet D, Aznar C. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Sep;65(1):69-72.
41. Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, et al. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr;45 (4):1261-5.

Correspondência

Jairo Ivo dos Santos

Departamento de Análises Clínicas, CCS, UFSC

Campus Universitário – Trindade

88040-970 – Florianópolis, SC

Tel 0XX48 3721-9856

E-mail: jairo.santos@ufsc.br

Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de tratamento intensivo: uma revisão

Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit: a review

Karla Taisa Pereira Colares¹

Ana Flávia de Andrade²

Letícia Antunes Athayde³

Resumo

As unidades de tratamento intensivo são de fundamental importância para o controle e tratamento das doenças mais graves que acometem o corpo humano. Apesar de seu papel inestimável e bem estabelecido, elas trazem algum grau de morbidade, e a ocorrência de infecções nosocomiais está claramente relacionada a este fato. Neste ambiente, o paciente fica mais susceptível ao risco de infecção, em função de sua condição clínica e a realização de diversos procedimentos invasivos. Diferentes microrganismos como bactérias, fungos e vírus causam infecções hospitalares. A *P. aeruginosa*, bactéria Gram negativa aeróbica, não fermentadora, tem recebido atenção especial pela frequência com que está relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, especialmente cepas multirresistentes. A utilização irracional de antibióticos está diretamente associada ao aumento da incidência de microrganismos multirresistentes e à consequente elevação dos custos de internações. Entre os principais fatores responsáveis pela utilização inadequada de antimicrobianos estão: o desconhecimento das doenças infecciosas, a incerteza do diagnóstico e a falta de consciência da gravidade da resistência bacteriana. Vale lembrar que a problemática da multirresistência se constitui uma ameaça não só para a sociedade, mas particularmente à indústria farmacêutica, que se encontra sem resposta terapêutica. Deste modo, conclui-se que é de fundamental importância a informação sobre o agente etiológico e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. Tais informações podem evitar o uso indiscriminado de antibióticos e o consequente surgimento de cepas multirresistentes.

Palavras-chave

Pseudomonas aeruginosa; UTI; Multirresistência

INTRODUÇÃO

As unidades de tratamento intensivos (UTI's) são consideradas de alto risco para aquisição de infecções por bactérias multirresistentes, considerando que os pacientes graves requerem cuidados intensivos prolongados e assim estão mais expostos a riscos de adquirirem infecções. Os fatores que contribuem para a alta taxa de infecção e mortalidade nessas unidades estão, possivelmente, associados à gravidade da doença de base, aos procedimentos invasivos, ao prolongado tempo de internação e ao uso de antibióticos, principalmente os de espectro ampliado, fazendo com que haja o surgimento de microrganismos multirresistentes, o que dificulta a terapêutica.

Mendonça et al.⁽¹⁾ descrevem que, desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva dos microrganismos

causada, principalmente, pelo uso indiscriminado dos mesmos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta outros fatores que têm contribuído para o aumento da incidência da multirresistência microbiana: pobreza, acesso inadequado aos medicamentos, propaganda de novas drogas, falha terapêutica, medicamentos falsificados e preferência pelos antimicrobianos de largo espectro, deficiência na formação de profissionais de saúde, alimentos contaminados com microrganismos resistentes, a globalização e, finalmente, deficiência na vigilância da epidemiologia intra e extra-hospitalar.

Estudiosos da área citam a *Pseudomonas aeruginosa* como um patógeno comum entre pacientes críticos, e as cepas multirresistentes são cada vez mais isoladas das colonizações e infecções epidêmicas e endêmicas nas unidades de tratamento intensivo.^(2,3) Com o uso abusivo e

¹Biomédica. Especialista em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Saúde Ibituruna – Fasi – Montes Claros, MG, Brasil.

²Biomédica. Pós-graduanda em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Saúde Ibituruna – Fasi – Montes Claros, MG, Brasil.

³Biomédica. Mestre em Biociências aplicada à Farmácia - FCFRP/USP. Especialista em Análises Clínicas. Docente da Fasi – Montes Claros, MG, Brasil.

indiscriminado de antimicrobianos, a incidência de *P. aeruginosa* multirresistente está aumentando e o tratamento clínico destas infecções se torna um desafio para a equipe de saúde.

Frente ao exposto, este estudo objetiva discurrir sobre a ocorrência de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* multirresistente em unidades de tratamento intensivo. Este trabalho tem caráter qualitativo, exploratório do tipo bibliográfico, uma vez que será elaborado a partir de material já publicado, constituído principalmente de livros, artigos de periódicos e materiais disponibilizados na internet.

REFERENCIAL TEÓRICO

Infecções hospitalares em UTI's

As UTI's são de fundamental importância para o controle e tratamento das doenças mais graves que acometem o corpo humano. Eles representam uma ferramenta poderosa na medicina moderna.⁽⁴⁾ Essas unidades são necessárias para prover dois serviços principais aos pacientes criticamente enfermos: suporte de vida para falências orgânicas graves e a monitorização intensiva que permita a identificação precoce e o tratamento apropriado das intercorrências clínicas graves. Elas atuam de forma decisiva quando há instabilidade de órgãos e sistemas funcionais com risco de morte.⁽⁵⁾

Apesar de seu papel inestimável e bem estabelecido, as UTI's trazem algum grau de morbidade, e a ocorrência de infecções nosocomiais está claramente relacionada a este fato; neste ambiente, o paciente fica mais suscetível ao risco de infecção em função de sua condição clínica e a realização de diversos procedimentos invasivos.⁽⁴⁾

A internação em UTI eleva o risco de aquisição de infecção hospitalar, inclusive com a ocorrência de microrganismos multirresistentes. Além disso, o paciente tem seu sistema imunológico comprometido, o que exige o uso de antimicrobianos, principalmente de última geração. De modo geral, estes são fatores determinantes na ocorrência de infecções, especialmente por cepas multirresistentes.⁽⁶⁾

Cabe ressaltar que o risco de infecção é diretamente proporcional à gravidade da doença, às condições nutricionais, à natureza dos procedimentos diagnósticos ou terapêuticos, bem como ao tempo de internação, dentre outros aspectos.^(6,7)

A infecção hospitalar não está associada apenas com um aumento considerável na morbidade e mortalidade dos pacientes em um hospital, mas também com os aumentos significativos nos custos,⁽⁴⁾ considerando o prolongamento da internação, o consumo de antibióticos, os gastos com isolamento e os exames laboratoriais.⁽⁷⁾

Wenzel et al.⁽⁸⁾ relataram que 5% dos indivíduos internados nas UTI's adquirirão uma infecção nosocomial,

o que resultará no aumento do tempo de internação, em torno de cinco a dez dias, e será considerada como consequência dos cuidados assistenciais em até 30% do total de casos.

As infecções hospitalares podem ter origem endógena, quando causadas pela microbiota residente do próprio paciente, ou exógena.⁽⁹⁾ Esta última inclui veículos como mãos, secreção salivar, fluidos corpóreos, ar e materiais contaminados, como, por exemplo, equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos. Muitos destes procedimentos são invasivos, isto é, penetram as barreiras de proteção do corpo humano, aumentando o risco de infecção. Os procedimentos médicos mais comumente associados com infecção hospitalar são cateterização urinária, cirurgia, terapia intravenosa, intubação respiratória e diálise renal.⁽¹⁰⁾

A infecção exógena pode se dar ainda por meio da contaminação de alimentos, água, ou medicamentos durante a sua produção ou manipulação hospitalar.⁽⁹⁾

Albrich et al.⁽¹¹⁾ afirmam que as UTI's são consideradas epicentros de resistência bacteriana, sendo a principal fonte de surtos de bactérias multirresistentes. Dentre os fatores de risco, tem sido muito ressaltado o consumo abusivo de antimicrobianos, os quais exercem pressão seletiva sobre determinados grupos de microrganismos, tornando-os resistentes. Além disso, o uso rotineiro de técnicas invasivas, a alta densidade de pacientes e a suscetibilidade dessa população, geralmente portadora de doenças graves, aumentam ainda mais o risco de infecção por microrganismos multirresistentes.

AGENTES BACTERIANOS

Diferentes microrganismos como bactérias, fungos e vírus causam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias que constituem a microbiota humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis devido à sua baixa virulência, mas que podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido, denominadas assim de bactérias oportunistas.⁽¹⁰⁾

De modo geral, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp. coagulase-negativa (SCN) e *Staphylococcus aureus* são os principais microrganismos responsáveis por infecção hospitalar em UTI's. Além destes, outros também comumente isolados são *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. e um membro da família *Enterobacteriaceae*.^(12,13)

É importante ressaltar que há diferenças na prevalência dos agentes etiológicos para cada sítio de infecção. O *Staphylococcus aureus* é mais comum em infecções de sítio operatório, infecções de corrente sanguínea relacionada a cateteres venosos centrais, infecção de prótese,

infecção de pele e infecção de trato respiratório; *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) em infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateteres venosos centrais e infecção de prótese; *Enterococcus* sp. em infecções urinárias, respiratórias e de corrente sanguínea; *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. e *Proteus* sp. associados a pneumonias, infecções de sítio cirúrgico e de corrente sanguínea; *Pseudomonas aeruginosa* acometendo pacientes crônicos, em ventilação mecânica prolongada ou pacientes traqueostomizados.⁽¹⁴⁾

A transmissão cruzada das infecções hospitalares tem um importante papel na sua cadeia epidemiológica. No ambiente hospitalar, os trabalhadores da área de saúde, ao prestar assistência a pacientes portadores persistentes ou manusear objetos colonizados podem contaminar suas mãos e subsequentemente transmitir o organismo para outros pacientes.⁽¹⁵⁾

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa aeróbica, não fermentadora, que se apresenta sob a forma de bastonetes isolados ou aos pares, movidos por flagelos polares.^(16,17) Esta espécie comumente habita o solo, água e vegetais e faz parte da microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e nas fezes de indivíduos saudáveis. Pode ser considerada oportunista, uma vez que causa doença em indivíduos imunocomprometidos.^(18,19)

A colonização humana ocorre em sítios úmidos como perineo, axilas, ouvidos. A umidade também é um fator crítico em reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa*, como equipamentos de ventilação mecânica, soluções de limpeza, desinfetantes de pias, panos de chão e são altamente resistentes à variação de temperatura.⁽²⁰⁾ Em situações epidêmicas tem sido demonstrada contaminação a partir de fonte comum, tais como respiradores, umidificadores, reservatórios de água, alimentos, água de torneiras e medicações, assim como transmissão de indivíduo para indivíduo, através das mãos, especialmente em UTI's, como resalta Martins et al.⁽²⁰⁾

Os microrganismos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares são as bactérias Gram negativas, como a *P. aeruginosa*, sendo comuns os relatos de eventos de resistência a antibióticos. Portadores assintomáticos são um veículo importante destes patógenos, no ambiente hospitalar.^(18,21,22) *P. aeruginosa* tem recebido atenção pela frequência com que está relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, acompanhado de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para esta espécie.⁽²³⁾ Apesar dos avanços tecnológicos em relação ao desenvolvimento de drogas de maior potência antibacteriana, suas características naturais de resistência

a mantêm em papel de destaque referente às dificuldades terapêuticas, afirma Arruda.⁽²⁴⁾

De fato, esta espécie tem sido associada a uma ampla variedade de infecções como bacteremias, infecções do trato urinário,⁽²⁵⁾ do trato respiratório e de ouvido e oculares, resultando, muitas vezes, em sepse fatal.

As infecções no trato urinário estão relacionadas ao uso de cateteres contaminados, que são colonizados tanto pela microbiota do paciente como por microrganismos presentes nas mãos dos indivíduos da equipe de enfermagem, entre outras fontes.^(18,26,27) A associação cateter-bacteriúria está diretamente relacionada ao tempo de duração do uso do implante. Este leva à bacteriúria, mais frequentemente, quando utilizado por mais de trinta dias. A bacteriúria pode ocasionar febre, cistites, pielonefrites, bacteremias e morte por sepse.^(26,28)

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos respondem por grande parte do consumo em hospitais, especialmente em unidades de pacientes mais graves, como as UTI's.⁽⁶⁾ Eles contribuem para a prevenção e redução nas complicações das infecções, dentre outros.^(6,7)

A utilização irracional de antibióticos está diretamente associada ao aumento da incidência de microrganismos multirresistentes e à consequente elevação dos custos de internações. Entre os principais fatores responsáveis pela utilização inadequada de antimicrobianos estão: o desconhecimento das doenças infecciosas, a incerteza do diagnóstico e a falta de consciência da gravidade da resistência bacteriana.

Na comunidade, as consequências do uso abusivo de antimicrobianos são bem exemplificadas pela emergência de cepas de pneumococos multirresistentes associada ao uso abusivo de penicilinas. Porém, é no ambiente hospitalar que o problema é mais preocupante, estando diretamente associado ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes a diversos antimicrobianos, com consequências diretas no prognóstico do paciente e no custo da internação.⁽²⁹⁾

Nesse ambiente, o uso racional de antimicrobianos é tido como arma essencial do sistema de prevenção das infecções hospitalares. O conhecimento dos princípios gerais nos quais se baseia o uso de antimicrobianos, assim como das propriedades e características básicas dos antimicrobianos disponíveis, permitiu fundar critérios científicos que dão segurança à sua indicação terapêutica ou profilática.⁽¹³⁾

Três fatores interligados devem ser considerados para escolha do antimicrobiano a ser prescrito: o estado clínico do paciente, o local ou sítio da infecção e o agente etiológico presumido ou comprovado.^(13,29)

Entre os microrganismos que apresentaram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o passar do tempo destacam-se: estafilococos, enterobactérias, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e, mais recentemente, hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos. Atualmente, a resistência entre as bactérias Gram positivas tem sido motivo de grande preocupação entre microbiologistas e médicos. As mesmas vêm se tornando bactérias-problema na terapêutica anti-infecciosa.⁽¹³⁾

Vale lembrar, ainda, que a problemática da multirresistência se constitui em ameaça não só para a sociedade, mas particularmente para a indústria farmacêutica, que se encontra sem resposta terapêutica.⁽⁷⁾

Deste modo, conclui-se que é fundamental a informação sobre os agentes etiológicos mais frequentes para cada tipo de infecção e em cada setor do hospital, sua sensibilidade aos diversos antibióticos e o resultado das culturas de cada infecção. Fatores esses que irão nortear o diagnóstico e definir o tratamento mais adequado para determinada infecção.⁽²⁹⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As UTI's constituem uma ferramenta poderosa na medicina moderna. No entanto, elas são consideradas de alto risco para aquisição de infecções por bactérias multirresistentes. Cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes têm sido frequentemente reportadas como agente causador de infecções nosocomiais, evidenciando assim a problemática da multirresistência. Deste modo, conclui-se que é de fundamental importância a informação sobre o agente etiológico e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. Tais informações podem evitar o uso indiscriminado de antibióticos e, conseqüentemente, o surgimento de cepas multirresistentes.

Abstract

The intensive care units are of fundamental importance for the control and treatment of major diseases affecting the human body. Despite their invaluable role and well established, they bring some degree of morbidity and the occurrence of nosocomial infections is clearly related to this fact. In this environment, the patient is more susceptible to infection risk, based on their clinical condition and performance of various invasive procedures. Different microorganisms such as bacteria, fungi and viruses cause infections in hospitals. The P. aeruginosa, gram-negative aerobic, non-fermenting, has received special attention to the frequency which is related to disease in patients with compromised immune systems, especially multidrug-resistant strains. The irrational use of antibiotics is directly associated with increased incidence of multidrug-resistant bacteria and the consequent increased costs of hospitalization. Among the main factors responsible for inappropriate use of antimicrobial us are: the lack of infectious diseases, the uncertainty of diagnosis and lack of awareness of the severity of bacterial resistance. Remember that the problem of multidrug resistance is a threat not only to society, but particularly the pharmaceutical industry, which is no therapeutic response thus

concludes that it is extremely important information about the etiologic agent and its susceptibility to antimicrobials. Such information may prevent the indiscriminate use of antibiotics and consequently the emergence of multidrug-resistant strains.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa; ICU; Multidrug resistance

REFERÊNCIAS

- Mendonça JS. Mecanismos de resistência bacteriana e suas implicações. In: Rodrigues EAC, et al. Infecções hospitalares - prevenção e controle. São Paulo: Sarvier, 1997. p.561-70.
- Blot S, Vandewoude K, Hoste E, Colardyn F. Reappraisal of attributable mortality in critically ill patients with nosocomial bacteraemia involving *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect. 2003 Jan;53(1):18-24.
- Ortega B, Groeneveld AB, Schultsz, C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Oct;25(10):825-31.
- Toufen Junior C, Hovnanian AL, Franca SA, Carvalho CR. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 2003 Sep-Oct;58(5):254-9.
- Moura MEB, et al. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. Rev. bras. enferm., Brasília. 2007;60(4): 416-21.
- Lima ME, Andrade D, Haas VJ. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de unidade de terapia intensiva. Rev. bras. ter. intensiva. São Paulo 2007. 9(3): 342-7. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2007000300013&lng=en&nrn=iso>
- Andrade D, Leopoldo VC, Haas VJ. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. Rev Bras Ter Intensiva. 2006;18(1):31-7.
- Wenzel RP, Edmond MB. Managing antibiotic resistance. N Engl J Med. 2000 Dec 28;343(26):1961-3.
- Moreira ACA, Carvalho JLM. Ocorrência de *Klebsiella pneumoniae* e outros coliformes em sabão neutro líquido utilizado em um berçário de hospital. Rev Ciênc Med Biol. 2006;5(3):245-52.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2004.
- Albrich WC, Angstwurm M, Bader L, Gärtner R. Drug resistance in intensive care units. Infection. 1999;27 Suppl 2:S19-23.
- Villas Boas PJF, Ruiz, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. Rev. Saude Publica 2004; 38(3):372-8.
- Menezes EA, Sá KM; Cunha FA; Ângelo MR; Oliveira IR; Salviano MN. Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na unidade de terapia intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. J Bras Patol Med Lab., Rio de Janeiro. 2007 June;43(3):149-55.
- Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar. Brasília: Ministério da Saúde; Ed. Anvisa, 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/medicina/manual_pediatria.pdf.
- Cavalcanti SMM, França ER, Vilela MA, Montenegro F, Cabral C, Medeiros, ACR. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de Hospital Universitário, Pernambuco, Brasil. Rev Bras Epidemiol 2006; 9: 436-46.
- Kiska DL Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray Pr, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (eds.) Manual of clinical microbiology. 7a. ed. Washington, DC: ASM Press; 1999. p.516-26.
- Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Microbiologia. 3a. ed. São Paulo, Atheneu, 1999. p. 421-2.

18. Silva CHPM. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis, RJ: Eventos; 1999.
19. Murray PR, et al. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
20. Martins ST, Moreira M, Furtado GH, Marino CG, Machado FR, Wey SB, Medeiros EA. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 May;99(3):331-4.
21. Frota CC, Moreira JLB. Frequency of nonfermentative gram-negative bacilli isolated from clinical materials of patients at Universidade Federal do Ceará Hospital Complex. Revista de Microbiologia. 1998; 29(3):179-81.
22. Fernandes AT. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.
23. Oliveira CA, Albuquerque PC, Rocha MLC. Infecções hospitalares. Rio de Janeiro: Atheneu; 1998.
24. Arruda EAG de. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical. 1998, set-out.;31(3): 503-4.
25. Nishi T, Tsuchiya K. Experimental urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Infect Immun. 1978 Nov;22(2): 508-15.
26. Johnson DE, Lockatell CV, Hall-Craggs M, Warren JW. Mouse models of short and long term foreign body in the urinary bladder: analogies to the bladder segment of urinary catheters. Lab Anim Sci. 1991 Oct;41(5):451-5.
27. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med. 2002 Jul 8;113 Suppl 1A:5S-13S.
28. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections Infect Dis Clin North Am. 1997 Sep;11(3):609-22
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

Correspondência

Karla Taisa Pereira Colares
Rua Diva Pinto, 174 – Rio Novo
39440-000 – Janaúba, MG
E-mail: kaka.colares@yahoo.com.br

Estreptococos β -hemolíticos do grupo B em gestantes

Streptococcal beta-hemolytic group B in pregnant women

Rosimeire Clotilde de Campos¹

Gisélia Aparecida Freire Maia de Lima²

Eliane Picoli³

Resumo

O estreptococos do grupo B é o agente mais frequente de infecções neonatais, sendo possível a sua prevenção. Para isso realiza-se a coleta dos locais específicos (região vaginal e retal) onde possa estar colonizado, semeia-se o material em meios próprios e que propiciem os nutrientes necessários para a bactéria crescer e observa-se a reação ao corante de Gram após esfregaço em lâmina e posterior coloração. Os cocos Gram positivos geralmente possuem uma parede celular relativamente espessa na qual o corante age e retém o cristal violeta, permitindo que a bactéria, ao ser observada ao microscópio com objetiva de 100x, apresente-se de coloração roxa. Dentre as provas bioquímicas utilizadas para identificação desses estreptococos está a prova do CAMP. Este teste é realizado semeando-se, em meio de agar sangue, a amostra a ser testada perpendicularmente a uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtora de β -hemólise. Os *Streptococcus* do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) são aqueles que apresentam prova do CAMP + (positiva), isto é, aqueles que formam uma área de hemólise típica em forma de ponta de seta. Uma série de bactérias está presente no nosso organismo sem, no entanto, trazer algum distúrbio. Porém, em algumas situações, a sua presença pode ocasionar consequências sérias. Este é o caso dos estreptococos β -hemolíticos grupo B nas gestantes, cuja presença, na hora do parto, pode causar doenças perinatais e também complicações durante o período neonatal. Estes organismos podem colonizar a vagina e o reto de mulheres grávidas, sendo algumas assintomáticas. O recém-nascido é colonizado por transmissão vertical, seja no útero ou durante o parto, a partir da mãe portadora, podendo também ser colonizado por exposição nosocomial após o nascimento. O espectro da doença inclui bacteremia, pneumonia, meningite, choque séptico e neutropenia.

Palavras-chave

Streptococcus do grupo B; Recém-nascidos; Gestantes

INTRODUÇÃO

Os lactobacilos fazem parte da microbiota normal da região vaginal. Este fato cria um mecanismo de defesa contra o crescimento e desenvolvimento de alguns tipos de patógenos. No período gestacional, no entanto, pode acontecer desequilíbrio nesta flora, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos associados a complicações.⁽¹⁾

O período considerado como período neonatal estende-se do nascimento até o 28º dia de vida completos, período este considerado com maior probabilidade de morte devido a infecções, asfixia e prematuridade.⁽²⁾

Os estreptococos são cocos (bactérias em formato esférico) aos pares ou em cadeias e que possuem coloração roxa ao método de coloração de Gram. Isto acontece devido à composição da parede celular dessas bactérias. Vale ressaltar que os estreptococos do grupo B fazem

parte da flora normal vaginal de 5% a 25% das mulheres, fazendo parte também da flora gastrointestinal.^(3,4)

Estudos verificaram que o índice de problemas perinatais e neonatais aumentaram muito, havendo, como consequência, a necessidade da pesquisa dessa bactéria nas 35 a 37 semanas de gestação, com o objetivo de uma profilaxia adequada para impossibilitar a transferência e colonização desses estreptococos para os recém-nascidos.^(5,6)

Rebecca Lancefield realizou um trabalho onde classificou os estreptococos β hemolíticos segundo um sistema de agrupamento. A base do trabalho realizado por Lancefield tem a classificação dos estreptococos de acordo com a detecção de antígenos presentes na superfície da parede celular dessas bactérias, tendo como objetivo a extração enzimática e a aglutinação com partículas de látex.⁽⁷⁾

¹Bióloga, Microbiologista. Laboratório de Análises Clínicas.

^{2,3}Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas – Campinas, SP, Brasil. Laboratório de Análises Clínicas.

Universidade Paulista - UNIP - São Paulo, SP, Brasil.

Artigo recebido em 19/10/2011

Artigo aprovado em 16/02/2016

No entanto, a classificação geral para posterior identificação dos estreptococos, é feita de acordo com o tipo de hemólise que esta bactéria produz no meio de cultura agar sangue. São classificados como gama-hemolíticos quando a bactéria não possui nenhuma capacidade de hemolisar o meio; sendo alfa-hemolíticos quando possuem uma capacidade parcial de hemolisar o meio e beta-hemolíticos quando possuem capacidade de provocar lise total das hemácias ao redor das colônias e que é o objeto de estudo deste trabalho.⁽⁸⁾

Os *Streptococcus agalactiae* estão classificados como uma das espécies bacterianas que possuem o antígeno do grupo B, sendo de grande importância por ser a causadora de muitas das septicemias, pneumonias e meningites em recém-nascidos e também por aumentar a chance de partos prematuros. A colonização por esta bactéria com consequência a algum tipo de patologia pode ser classificada de duas formas: doença de início precoce e a doença de início tardio. Os estreptococos β -hemolíticos foram apontados como causadores de grande morbimortalidade nos Estados Unidos nos anos 70. Na década de 80, estudos demonstraram que o uso de antibioticoterapia durante o parto prevenia a transmissão dos estreptococos β -hemolíticos para os recém-nascidos. Desde então, mais estudos foram realizados no intuito de diminuir a taxa de transmissão desta bactéria.^(9,10)

Uma das técnicas utilizadas para isolar com maior probabilidade os estreptococos β -hemolíticos do grupo B, em amostra onde se pode ter uma flora mista, é o uso de um caldo chamado Todd Hewitt. O meio atualmente utilizado sofreu modificação do meio original, pois estes, pela fermentação da glicose utilizada como composto, estimulava o crescimento bacteriano, no entanto levava à destruição das hemolisinas pelo ácido produzido durante a reação. Desta forma, o meio atualmente utilizado é tamponado com bicarbonato de sódio e fosfato de sódio.⁽⁷⁾

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão bibliográfica, com levantamento de dados que relatam a importância na detecção precoce do *Streptococcus agalactiae* em gestantes e abordagem desse o metabolismo e patogenicidade da bactéria até o seu diagnóstico para profilaxia e tratamento adequado.

DISCUSSÃO

Os estreptococos estão classificados dentro da família *Streptococcaceae*. São bactérias Gram positivas e possuem a reação à prova da catalase negativa devido ao fato de não apresentarem enzimas citocrômicas em sua parede celular. Ou seja, não possuem a enzima intracelular en-

contrada na maioria dos organismos que decompõem o peróxido de hidrogênio.⁽¹¹⁾

São bactérias anaeróbicas facultativas, no entanto algumas cepas desenvolvem-se melhor em anaerobiose e com atmosfera de dióxido de carbono (crescimento captonofílico). As bactérias do gênero *Streptococcus* foram classificadas, por Sherman, em 1937, em quatro grupos: *piogênicos*, *viridans*, *lacti* e *enterococci*, sendo que o *Streptococcus agalactiae* ficou classificado no grupo B dos piogênicos.⁽¹²⁾

Até o presente momento são aceitos vários tipos de classificação com base na aplicação de técnicas genéticas, como a hibridização DNA-DNA, hibridização DNA-RNA ribossômico e sequenciamento da subunidade 16S do RNA ribossômico.⁽²⁾

Os estreptococos do grupo B possuem ainda como característica fisiológica a resistência aos antibióticos bacitracina e sulfametaxazol-trimetropim, incapacidade de crescer em meio que possua a presença de bile e é a única espécie entre os estreptococos capaz de produzir o fator CAMP.⁽¹³⁾

A grande parte das bactérias de importância médica é classificada como homo fermentadoras ou seja bactérias que possuem o ácido lático como único produto no processo de fermentação da glicose.⁽⁷⁾

Essas bactérias possuem também reação negativa à oxidase, que se refere a um teste baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria. Possuem também na composição da parede celular a primeira camada de glicopeptídeo (carboidratos, ácido teicoico, lipoproteínas e proteínas antigênicas de superfície). Este último foi utilizado no trabalho de Rebecca Lancefield para classificação sorológica com base nos carboidratos encontrados, onde se realiza extração enzimática e aglutinação ou coaglutinação em partículas de látex.⁽⁷⁾

Os estreptococos do grupo B possuem um antígeno de agrupamento, ou seja, um polissacarídeo específico da superfície celular e um antígeno proteico.⁽¹¹⁾ Essas bactérias possuem necessidades nutricionais complexas, sendo necessários meios enriquecidos com sangue ou soro para o seu desenvolvimento.⁽¹¹⁾

A classificação mais utilizada está na capacidade destas bactérias provocarem hemólise ou lise (morte celular) em eritrócitos de meios de cultura contendo sangue, podendo ser α -hemolíticos (hemólise parcial), β -hemolíticos (hemólise total) e γ -hemolíticos (sem produção de hemólise).⁽¹¹⁾

Os estreptococos do grupo B, *agalactiae*, tornaram-se bem conhecidos devido ao fato de causarem sepse, pneumonia e meningite em crianças, podendo também ser a causa de doenças graves em adultos. Este microrganismo pode ser causador de partos prematuros e, conseqüentemente, crianças prematuras com maior risco de contrair doenças.⁽¹¹⁾

Em gestantes, os EGB podem provocar infecção do trato urinário, amnionite, endometrite e bacteremia.⁽¹⁰⁾

Desde o período da menarca até a menopausa, existe na microbiota normal da vagina uma grande quantidade de lactobacilos, isto se deve à influência hormonal, principalmente o estrogênio, o que aumenta a quantidade de glicogênio no epitélio vaginal e propicia a formação de ácido lático através da metabolização do glicogênio pelos lactobacilos. Isto gera um aumento da acidez vaginal (aproximadamente um pH entre 4,4 a 4,6), o que dificulta o estabelecimento de microrganismos patogênicos na região.⁽¹⁴⁾

Os EGB são bactérias que fazem parte da flora normal de membranas mucosas nos seres humanos, colonizando com maior frequência o trato gastrointestinal e genitourinário.⁽²⁾

A composição da parede celular dessas bactérias (camada espessa de peptidoglicanos) permite que estas sobrevivam em superfícies secas. Os antígenos de superfícies (polissacarídeos capsulares) inibem a fagocitose, não permitindo que os microrganismos sejam englobados ou "digeridos" pelas células do sistema imunológico. Existe uma deficiência de anticorpos contra estes antígenos, chamada tipo-específico, o que auxilia no desenvolvimento de doenças. A enzima hidrolítica produzida facilita a destruição tecidual e a disseminação destas bactérias.⁽¹¹⁾

Na classificação de Lancefield, os EGB são classificados em diferentes sorotipos, e a enzima hidrolítica produzida facilita a destruição tecidual e a disseminação destas bactérias, sendo que 60% dos isolados de septicemia neonatal e 80% de infecções provenientes de lactentes com meningite pertencem ao tipo II da EGB, o que sugere que este grupo tenha maior virulência.⁽⁷⁾

A estrutura deste tipo é composta de N-acetilneuramínico (ácido siálico), o que provavelmente inibe a ativação do sistema complemento evitando assim a fagocitose.⁽⁷⁾

Uma série de fatores de risco está associada às infecções neonatais. Desses fatores, a colonização materna no momento do parto é de maior importância.⁽¹⁵⁾

A colonização neonatal pela EGB pode ocorrer durante o trabalho de parto, por transmissão vertical, ou por via ascendente, através de membranas íntegras ou rotas. Pode ocorrer pelo contato do microrganismo com tecidos fetais ou por aspiração de secreções vaginais pelo feto; 50% dos recém-nascidos podem ser colonizados se as mães forem colonizadas, independente da via do parto. Desta taxa, 2% dos recém-nascidos se tornam infectados.^(2,5)

A colonização assintomática nas gestantes contribui para o quadro epidemiológico, estando os neonatos com mais risco de infecção se ocorrer ruptura prematura das membranas, se o parto for prolongado, se houver nasci-

mento prematuro ou se a mãe tiver a doença pelo EGB disseminada, estando sem anticorpos tipo-específico e com baixos níveis de complemento.⁽¹¹⁾

Doença neonatal de início precoce

Esta doença está associada com a aquisição da bactéria no útero ou durante o período perinatal. A infecção é adquirida de forma ascendente no útero antes do parto, através das membranas fetais rompidas ou durante o parto. A doença ocorre nos primeiros cinco dias de vida.⁽⁷⁾

A doença de início precoce é caracterizada por bacteremia, pneumonia ou meningite. A taxa de mortalidade diminui com um diagnóstico rápido e tratamento. No entanto, algumas crianças podem apresentar sequelas neurológicas decorrentes da meningite.⁽¹¹⁾

Doença neonatal de início tardio

A doença acontece em média de três a quatro semanas após o nascimento, sendo adquirida através de uma fonte exógena, como, por exemplo, de pessoas que cuidam da criança ou do ambiente hospitalar.^(7,11) A manifestação mais grave é a bacteremia associada a meningite, sendo a doença que predomina neste período; a taxa de mortalidade é maior do que na doença de início precoce devido aos comprometimentos neurológicos.^(7,11)

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

No trato genital feminino pode ser encontrada uma ampla variedade de agentes bacterianos, fúngicos, parasitários e virais que podem ocasionar uma série de doenças, podendo ser assintomáticos e passarem despercebidos pela paciente. Os estreptococos do grupo B podem ser encontrados em mulheres, como saprófita da vagina, por isto a importância do diagnóstico entre a 35ª e a 37ª semanas de gestação.⁽¹⁶⁾

Um trabalho desenvolvido entre 2002 e 2003 por Beraldo e colaboradores relata a importância da coleta de secreções na região vaginal e anorretal com maior probabilidade de diagnóstico. A pesquisa relata que foi detectada uma porcentagem de pacientes com positividade em apenas um dos locais de coleta da amostra, mostrando que a paciente está colonizada independente do local.⁽¹⁷⁾

De uma forma geral, as amostras solicitadas pelos médicos e coletadas pelo laboratório, durante a gestação, são muito importantes para prognosticar se a paciente apresenta colonização vaginal por esta bactéria.⁽⁷⁾

DIAGNOSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é feito em correlação com a suspeita clínica, daí a importância da prescrição ou pedido correto do médico entre a 35ª e a 37ª semanas de

gestação. A coleta do EGB deve ser feita em nível ambulatorial, sem uso de espéculo, coletando uma amostra do introito vaginal e da região anal. Pode-se usar o mesmo *swab* na frequência vagina-ânus ou dois *swabs* separados.⁽⁵⁾

Após a coleta, o *swab* deve ser inoculado em caldo Todd-Hewitt, que contém uma associação de gentamicina 8 $\mu\text{g/ml}$ e ácido nalidixico 15 $\mu\text{g/ml}$. A associação destes antibióticos ao meio inibe a flora local e permite o isolamento do EGB. Posteriormente, estriar a amostra em meio de cultura e incubar por 18 a 24 horas a uma temperatura de $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ em ambiente com 5% de CO_2 .⁽⁵⁾

Após este período, inspecionar as placas e verificar as colônias suspeitas ou sugestivas com hemólise ou não e prosseguir com a identificação.^(5,18)

A utilização de meio de cultura seletivo contendo antibiótico (Todd Hewitt) aumenta a probabilidade de detecção do EGB quando comparado ao meio de cultura não seletivo.⁽¹⁵⁾

Detecção de antígeno

Este método é realizado por meio da aglutinação com látex. O intuito é detectar o antígeno-específico existente na parede celular dos estreptococos pela classificação sorológica dos estreptococos de origem humana desenvolvido por Rebecca Lancefield.^(7,11)

Testes baseados em Ácidos Nucleicos

Recentemente tem sido usada técnica de PCR para a triagem das mulheres grávidas. O uso desta técnica demonstra uma sensibilidade de 97% e especificidade de 100%, dando um resultado rápido o que facilita a pesquisa em mulheres em trabalho de parto. Esta técnica de identificação ainda está sendo aprimorada.⁽⁵⁾

Esfregaços diretos corados pelo GRAM

Os esfregaços preparados a partir de cultivos de estreptococos demonstram cocos Gram positivos aos pares ou em cadeias.⁽⁷⁾

Prova da catalase

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio utilizado na reação, em água e oxigênio, resultando na formação de bolhas, o que indica positividade do teste. No caso do estreptococos, isto não acontece, pois os mesmos reagem de forma negativa à prova de catalase, o que os difere dos estafilococos.⁽¹⁹⁾

Bacitracina e Sulfametoxazol-Trimetropim

A bactéria é semeada em meio de cultura (Mueller Hinton Sanguine) com o auxílio de um *swab* e disposto 1 disco de bacitracina e 1 disco de sulfametoxazol-trimetropim; os EGB apresentam resistência a estas drogas.⁽⁷⁾

Prova do CAMP

Considerada como identificação preliminar em amostras isoladas, a prova de CAMP é realizada utilizando-se uma cepa produtora de β -hemolisina (ATCC 25923). Como algumas outras bactérias podem ter a prova de CAMP positiva, geralmente realiza-se o teste da bacitracina e sulfametoxazol-trimetropim na mesma placa.⁽⁷⁾

O fator CAMP é uma proteína termostável que intensifica a lise das hemáceas produzidas pela beta-lisina do *Staphylococcus aureus*, resultando em uma zona de hemólise em forma de seta.⁽¹³⁾

Hidrólise de Hipurato de Sódio

Nesta prova, o microrganismo é semeado em caldo contendo Hipurato de Sódio e incubado de 18 a 24 horas a uma temperatura de 35°C . Após este período deve-se centrifugar o caldo e separar o sobrenadante, adicionando-se a este 0,8 mL de cloreto férrico. Após a adição deste reagente, irá formar um precipitado que deve permanecer por mais de dez minutos, indicando a presença de ácido benzoico e, portanto, positividade do teste.⁽⁷⁾

Caldo Granada

Meio de cultura diferencial utilizado para isolamento e identificação de EGB após inoculação e incubação da amostra por 18 a 24 horas a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. O meio detecta o Granadaene, um pigmento poliênico vermelho, que permite a diferenciação do EGB de outras bactérias. Qualquer intensidade de pigmentação para cor laranja indica positividade do teste.⁽²⁰⁾

PROFILAXIA E TRATAMENTO

Em 2002, a CDC publicou um protocolo que preconiza a profilaxia com uso de antibióticos em gestantes portadoras assintomáticas de EGB ou em presença de fatores de risco.⁽¹⁰⁾

Existem duas estratégias para indicação de profilaxia com drogas antimicrobianas: a primeira usando como base o grupo de risco (trabalho de parto inferior a 37 semanas de gestação, febre intraparto, ruptura da membrana amniótica superior a 18 horas); a segunda usando como base a cultura coletada no final da gestação, semelhante a casos da presença da bactéria em gestações anteriores.⁽²⁾

Os estreptococos do grupo B apresentam sensibilidade à penicilina, fazendo com que esta seja a droga de escolha no tratamento de pacientes portadores. Porém, algumas cepas têm apresentado tolerância a esta droga, ou seja, possuem poder inibidor mas não matam o microrganismo. Por este motivo, a droga tem sido usada em combinação com um aminoglicosídeo.⁽¹¹⁾

Uma outra droga, a vancomicina, tem sido usada para pacientes que apresentam alergia à penicilina, já que

outras drogas, como eritromicina e tetraciclina, têm apresentado resistências.⁽¹¹⁾

De acordo com o CDC 2002 (*Centers for Disease Control and Prevention*), a penicilina G é recomendada em 5 milhões de unidades, como dose de ataque e 2,5 milhões de unidades a cada 4 horas até o parto. Uma outra alternativa é a ampicilina 2 g na dose de ataque e 1 g a cada 4 horas até o parto.⁽²⁾

Em pacientes alérgicas a esta droga recomenda-se 900 mg de clindamicina endovenosa a cada 8 horas até o parto ou 500 mg de eritromicina endovenosa a cada 6 horas até o parto quando a paciente for considerada de alto risco (hipersensibilidade, angioedema, urticária e asma), ou utilizar cefazolina 2 g como dose de ataque e 1 g a cada 8 horas até o parto para pacientes com baixo risco. Caso a paciente seja alérgica ou de alto risco, ou que apresente resistência às drogas citadas, a vancomicina na dose de 1 g a cada 12 horas até o parto é recomendada.⁽²⁾

CONCLUSÕES

A cultura em meio agar sangue ainda é considerada o melhor teste bacteriológico para detecção dos estreptococos β -hemolíticos.

Testes simples como coloração de Gram e prova da catalase devem ser feitos para verificar a morfologia e descartar outro gênero de bactéria como os estafilococos, por exemplo, que podem ser produtores de β -lisina. Posteriormente, testes bioquímicos ou de aglutinação do látex definem o sorogrupo ao qual a bactéria pertence.

A utilização de um meio de cultura seletivo aumenta significativamente a probabilidade de isolamento do EGB.

A grande maioria dos casos de sepse em RN ocorrem em consequência de mães que não receberam conduta intraparto corretamente e que não foram submetidas a rastreio bacteriológico ou o fizeram antes da 35ª semana de gestação.

Nos casos de septicemia nos recém-nascidos, é necessário associar dados clínicos e microbiológicos, o que inclui queda de estado geral (hipotermia, ou hipertermia), hiperglicemia, apneia, insuficiência respiratória, choque e sangramento. Estes dados devem ser complementados com exames laboratoriais como Hemograma, nível de Plaquetas, Proteína C Reativa, Hemocultivo e Cultura do Líquor.

As infecções em crianças acontecem em 75% de forma precoce, manifestando-se na primeira semana de vida, em geral antes das 72 horas.

Pode ocorrer, mais raramente, a infecção *in utero*, por este motivo a cesariana não é recomendada como preventivo.

Quando se tem uma pesquisa positiva ou negativa desta bactéria no início da gravidez, não é garantia que ao

final da gestação a paciente possa estar na mesma condição.

Em países que adotaram como medida profilática a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* e o uso de antibióticos intraparto, verificou-se um decréscimo significativo de doenças em consequência desta bactéria.

O uso de profilaxia antimicrobiana intraparto tem reduzido em até 70% doenças neonatais pelo *Streptococcus agalactiae* nos EUA.

No Brasil, a pesquisa do EGB em gestantes não faz parte do protocolo de acompanhamento pré-natal. (Ministério da Saúde, 2005). Esse trabalho fica na maioria das vezes vinculado a serviços universitários de assistência materna.

Abstract

The Group B Streptococcus is the most frequent agent of neonatal infections, and possible prevention. To do this takes place the collection of specific sites (rectal and vaginal area) where it may be colonized, the material is sown in its own and that provide the nutrients needed to grow the bacteria and observe the reaction to Gram stain after smear slide and subsequent staining. The Gram-positive cocci usually have a relatively thick cell wall in which the acts and retains the dye crystal violet, allowing the bacteria to be observed under the microscope with a 100X lens is present purple color. Among the biochemical tests used for identification of streptococci, is proof of CAMP, this test is performed sowing themselves in blood-agar, the sample to be tested perpendicularly to a sample of Staphylococcus aureus producing beta-hemolysis. The Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae) are those that have come from the field + (positive), ie those that form an area of typical hemolytic-shaped arrowhead. A number of bacteria are present in our body without, however, bring some disorder. However, in some cases their presence may lead to serious consequences. This is the case of β -hemolytic streptococcus group B in pregnant women, their presence at the time of delivery, and perinatal diseases can also cause complications during the neonatal period. These organisms can colonize the vagina and rectum of pregnant women, and some are asymptomatic. The newborn is colonized by vertical transmission, either in utero or during delivery from the carrier mother. It can also be colonized by nosocomial exposure after birth. The spectrum of disease includes bacteremia, pneumonia, meningitis, septic shock and neutropenia.

Keywords

Group B Streptococcus; Newborns; Pregnant women

REFERÊNCIAS

1. Lajos GJ, Passini Junior R, Nomura ML, Amaral E, Pereira BG, Milanez H, Parpinelli MA. Colonização bacteriana do canal cervical em gestantes com trabalho de parto prematuro ou ruptura prematura de membranas. Rev Bras GinecolObstet. 2008;30(8):393-9.
2. Castellano Filho D, Tibiracá S, Diniz C. Doença perinatal associada aos estreptococos do grupo B: aspectos clínico-microbiológicos e prevenção. HU Revista, Juiz de Fora, vol 34, n. 2, abr/jun 2008. Disponível em: <http://ojs.hurevista.ufjf.br > Acesso em: 10 jun 2011.
3. Awetz E, Melnick JL, Adelberg E. Microbiologia Médica. Editora McGrawHill (Lange), 24ª Edição. Rio de Janeiro: 2008. ISBN: 978-85-77260-52-2.
4. Veit AR, et al. Colonization Prevalence and Susceptibility of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women at Hospital Santa Maria. Revista Saúde (Santa Maria), v. 36, n. 1, p.914, jan/jun.2011.

5. Carvalho RL. Colonização de gestantes pelo estreptococo do grupo B: prevalência, fatores associados e cepas virulentas. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Saude da Criança) - Faculdade de Medicina da PUCRS, Porto Alegre, 2009.
6. Pogere A, Zoccoli CM, Tobouti NR, Freitas PF, d'Acampora J, Zunino JN. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(4):174-80.
7. Koneman EW, Diagnostico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. ISBN 8527713772.
8. Silva CH. Bacteriologia: um texto ilustrado. 1ª Ed. Teresópolis-RJ: Eventos, 1999. ISBN 8586582050.
9. Costa AL, et al. Prevalência de colonização por estreptococos do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]. 2008, vol.30, n.6, pp. 274-280. ISSN 0100-7203.
10. Sa C, et al. Infecção perinatal por Streptococcus Agalactiae pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos, factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal. S. Acta Pediátrica Portuguesa. Rev. Med. da Criança e do adolescente. Vol 41, n.1. Portugal, jan/fev 2010.
11. Murray PR. Microbiologia Médica. 5ªed. Rio de Janeiro: Elsever, 2006. ISBN-8535218386.
12. Borger IL. Estudos da colonização por Streptococcus agalactiae em gestantes atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Niterói: s.n., 2005.
13. Caetano MS. Colonização pelo Streptococcus agalactiae (EGB) em gestantes atendidas na rede publica de Uberaba-MG. 2008. 78 f. Dissertação (pós-graduação Patologia Clínica) - Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Uberaba, 2008.
14. Sidrim JC, Rocha M. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004.
15. Nomura ML, Passini Júnior R, Oliveira UM, Calil R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009; 31(8):397-403.
16. Oplustil CP, Zoccoli CM, Cássia M, Tobouti NR. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2004. ISBN 8573782153.
17. Beraldo C, Brito ASJ, Saridakis HO, Matsuo T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por Estreptococo do Grupo B em gestantes do terceiro trimestre. Rev Bras Ginecol Obstet. 2004; 26(7):543-9.
18. Ferreira AW, Ávila SL. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças infecciosas e auto-imunes. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
19. Anvisa - Descrição dos Meios de Cultura empregados nos Exames Microbiológicos - Módulo IV - Anvisa. Disponível em www.anvisa.gov.br/servicosau/manuel/microbiologia.asp
20. Araújo MJ. Perfil de Susceptibilidade do Streptococcus agalactiae a Antimicrobianos. Tese para obtenção do título de mestre apresentado ao departamento de Biologia da Universidade Aveiro, 2010.

Correspondência

Rosimeire Clotilde de Campos
Rua Calendula Nº 46 - Jd. Boa Vista
13187-044 – Hortolândia, SP
E-mail: campos.rosi@hotmail.com

Ocorrência de enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido em isolados clínicos no sul do Brasil

Occurrence of extended spectrum β -lactamases producing enterobacteria in clinical isolates in south of Brazil

Aldalise Lago¹

Sergio Roberto Fuentefria²

Daiane Bopp Fuentefria³

Resumo

O principal mecanismo de resistência emergente entre *enterobacteriaceae* é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas-de-amplio-espectro, que são amplamente utilizadas na terapia antimicrobiana de infecções por enterobactérias. Embora a resistência a esses agentes apresente grande variabilidade geográfica, os índices de resistência são elevados em diversos países. Um estudo observacional, transversal, descritivo e retrospectivo foi desenvolvido para avaliar a frequência de ESBL entre cepas de *enterobacteriaceae* obtidas no Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo, RS, Brasil. A produção de ESBL foi observada em 24,8% (n = 208/838) dos isolados avaliados. Isolados de *Escherichia coli* representaram 52,8% (n = 110/208) do percentual de produtores de ESBL, seguido de espécies de *Enterobacter* 30,3% (n = 63/208). A sensibilidade desses isolados ao meropenem foi de 91,4% e à piperacilina/tazobactam de 67,4%. Os índices de ESBL encontrados confirmam a preocupação mundial com este mecanismo de resistência.

Palavras-chave

ESBL; Enterobactérias; Resistência bacteriana; Estudo transversal

INTRODUÇÃO

A produção de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) é um importante mecanismo de resistência em enterobactérias. O tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL oferece um substancial desafio à terapia antimicrobiana, pois as ESBLs são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, minimizando as opções terapêuticas. Somente alguns antibióticos β -lactâmicos conservam sua atividade frente a cepas produtoras de ESBLs.⁽¹⁾ Aliado a isso, o uso contínuo e muitas vezes inadequado de agentes antimicrobianos pode induzir à seleção de cepas multirresistentes.⁽²⁾

As ESBLs estão frequentemente associadas a infecções urinárias, pneumonias, septicemias, bacteremias, meningites entre outras inúmeras infecções.⁽³⁻⁸⁾ Os principais gêneros produtores de ESBLs, dentre as enterobactérias, são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Providencia* sp. e *Enterobacter* sp.⁽²⁾ Entero-

bactérias produtoras de ESBLs estão amplamente disseminadas, já tendo sido reportadas na França, Estados Unidos, Reino Unido, Grécia, Holanda, Hungria, Portugal, Bolívia, Peru, Brasil, entre outros.⁽⁹⁻¹³⁾

Atualmente, existem mais de 150 variantes conhecidas de ESBLs, as quais têm causado grande preocupação entre microbiologistas e infectologistas.⁽¹⁴⁾ A maioria das ESBLs atualmente conhecidas são oriundas das mais antigas β -lactamases tipo TEM-1, TEM-2, e SHV-1,⁽¹⁵⁾ as quais diferem dos seus progenitores por poucos aminoácidos. Nessa escala evolutiva, podem-se encontrar denominações como SHV-2, OXA-10, PER-1, PER-2, VEB-1, CTX-M entre outras.^(14,16)

O monitoramento da ocorrência de cepas produtoras de ESBL em enterobactérias de interesse clínico contribui para delinear a amplitude do problema e para definir opções de tratamento e medidas de contenção adequadas.⁽¹⁷⁾ Como muito pouco é conhecido sobre a ocorrência de cepas produtoras de ESBLs em Passo Fundo, RS, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de ESBLs em isola-

¹Bióloga.

²Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e Laboratório SANI, Passo Fundo, RS, Brasil.

³Laboratório SANI, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Artigo recebido em 16/02/2010

Artigo aprovado em 16/02/2016

dos clínicos de enterobactérias no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), bem como avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos na presença dessas enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) em Passo Fundo, RS, Brasil. Este hospital possui 560 leitos e 101 leitos de apoio e uma área construída de 45.000 m², realizando cerca de 28.000 internações ao ano.

Delineamento do estudo e coleta de dados

Realizou-se um estudo retrospectivo observacional transversal que incluiu os pacientes internados no HSVP e cujas culturas bacterianas foram realizadas no período de agosto a dezembro de 2007. Foram coletados dados demográficos como sexo, unidade de internação hospitalar, número de registro laboratorial do paciente e dados referentes ao paciente, como tipo de amostra biológica, identificação bacteriana e antibiograma. Os dados dos pacientes com culturas positivas para enterobactérias produtoras de ESBL foram avaliados. Os dados foram coletados por meio do sistema interno de computadores do HSVP no Laboratório de Análises Clínicas. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Projetos, pela Comissão de Ética e pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital São Vicente de Paulo.

Identificação de cepas, antibiograma e triagem fenotípica da produção de ESBL

As amostras biológicas foram identificadas por meio da coloração de Gram e algumas provas como fermentação de glicose, sacarose e lactose, motilidade, produção de H₂S, gás, indol e, quando necessário, a identificação foi confirmada pelo painel de Gram negativos do Auto-Scan-4 (Dade Microscan, Inc., Sacramento, CA, USA). O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela metodologia de disco-difusão, de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). A triagem fenotípica para produção de ESBL foi realizada pela técnica de disco aproximação também segundo as normas do CLSI.⁽¹⁸⁾

Análise Estatística

Sobre as culturas positivas, calculou-se a frequência de infecções causadas por enterobactérias. Dentre as culturas positivas para enterobactérias, o percentual de cepas produtoras de ESBL foi calculado. Os dados das culturas positivas e cepas produtoras de ESBL foram comparados com o tipo de amostra biológica, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados e a dados

demográficos, como sexo e unidade de internação. A análise comparativa entre a presença de ESBL e as diferentes características avaliadas foi realizada com o teste Exato de Fisher. Para avaliar a relação entre infecção por cepas produtoras de ESBL e as diferentes espécies bacterianas, tipos de amostra biológica e unidades de internação foi realizada uma análise univariada (*Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate*); a razão de chances (ODs) e 95% de intervalo de confiança (CI) são reportados. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (versão 11.0); $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Foram analisadas durante o período de estudo 4.888 culturas. O percentual de culturas positivas foi de 31,6% ($n = 1.546/4.888$). Dentre essas, 54,2% ($n = 838/1.546$) foram identificadas como enterobactérias. Dentre as culturas positivas identificadas como enterobactérias, 24,8% ($n = 208/838$) dos isolados apresentaram teste de triagem positivo para produção de ESBL. Dentre os isolados produtores de ESBL, *Escherichia coli* foi a espécie prevalente, com 52,8% ($n = 110$), seguida de *Enterobacter* sp., com 30,3% ($n = 63$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais gêneros de enterobactérias encontrados entre os isolados produtores de ESBL do Hospital São Vicente de Paulo ($n = 208$)

Enterobactérias	Produção de ESBL (%)
<i>Escherichia coli</i>	110 (52,8)
<i>Enterobacter</i> sp.	63 (30,3)
<i>Proteus mirabilis</i>	12 (5,8)
<i>Serratia</i> sp.	7 (3,4)
<i>Klebsiella</i> sp.	5 (2,4)
<i>Proteus</i> sp.	4 (1,9)
<i>Citrobacter</i> sp.	3 (1,4)
<i>Edwardsiella</i> sp.	1 (0,5)
<i>Proteus vulgaris</i>	1 (0,5)
<i>Providencia</i> sp.	1 (0,5)

Os isolados produtores de ESBL foram recuperados principalmente de amostras de urina ($n = 79$), secreção traqueal ($n = 23$), aspirado traqueal ($n = 17$), escarro ($n = 16$). Outros tipos de amostras biológicas, como cateteres, fezes, lavados e aspirados brônquicos, ocorreram em menor frequência. Ao todo, ocorreram 129 casos de cultura positiva com produção de ESBL em pacientes do sexo masculino e 79 em pacientes do sexo feminino.

Foi observada uma variação nos índices de culturas positivas produtoras de ESBLs nos diferentes setores hospitalares, sendo que o maior índice identificado ocorreu no

Centro de Terapia Intensiva Central (CTI-C) com 36 isolados, seguido do Posto 7 (P.07) com 33 pacientes infectados e Centro de Cuidados Intensivos de Enfermagem (CCIE) com 16 casos constatados. Outros setores também apresentaram culturas positivas com produção de ESBLs, porém em menor número.

Na análise univariada, os seguintes gêneros bacterianos apresentaram relação com produção de ESBL: *E. coli*, *Enterobacter* sp., *E. coli* sacarose negativa e *Serratia* sp. ($p < 0,05$). Isolados do gênero *Enterobacter* sp. apresentaram 8,43 vezes maior chance de serem produtores de ESBL, sendo que 49,6% de *Enterobacter* sp. foram produtores de ESBL. Dentre as diferentes amostras biológicas avaliadas, escarro, urina, fezes, secreção traqueal e líquido abdominal apresentaram significância estatística ($p < 0,05$), sendo que infecções de líquido abdominal, secreção traqueal e urina apresentaram respectivamente 2,72, 2,35 e 1,9 maior chance de serem causadas por um isolado produtor de ESBL. Dentre todas as culturas positivas de líquido abdominal, 29,6% foram causadas por cepas produtoras de ESBL. Dentre as diferentes unidades de internação que apresentaram relação significativa com presença de ESBLs, os postos de enfermagem P.07 e P.06 apresentaram chances 2,39 e 2,13 vezes maiores de infecções por isolados produtores de ESBL (Tabela 2). Os dados apresentados na Tabela 2 apresentaram $p < 0,05$ e foram considerados estatisticamente significativos.

Conforme esperado, 100% das cepas isoladas como produtoras de ESBL foram resistentes a todas as cefalosporinas e aztreonam. Foram observados 71,6%

Tabela 2 - Análise univariada para variáveis associadas com infecção por isolados produtores de ESBL

Variáveis analisadas		OD (95% CI)	%
Enterobactéria	<i>E. coli</i>	2,23 (1,66-3,00)	20,7
	<i>Enterobacter</i> sp.	8,43 (6,73-12,4)	49,6
	<i>E. coli</i> sacarose negativa	1,99 (1,07-3,68)	23,3
	<i>Serratia</i> sp.	2,73 (1,18-6,31)	29,6
Amostra Biológica	Escarro	0,45 (0,06-0,76)	7,2
	Urina	1,90 (1,40-2,58)	19,8
	Fezes	0,26 (0,12-0,56)	4,3
	Secreção traqueal	2,35 (1,43-2,87)	25,8
	Lavado brônquico	0,17 (0,02-1,22)	2,6
	Líquido abdominal	2,72 (1,18-6,31)	29,6
	Unidade de Internação	Emergência	0,38 (0,21-0,70)
Posto 07		2,39 (1,56-3,65)	25,6
CTI-Central		1,78 (1,20-2,65)	20,6
CTI-Pediátrico e Neo-natal		0,15 (0,02-1,07)	2,3
Posto 01		0,22 (0,54-0,92)	3,5
Posto 06		2,13(1,22-3,69)	24,3

de resistência a sulfametoxazol/trimetoprim e 32,6% de resistência a piperacilina/tazobactam, indicando a possibilidade da presença de outro mecanismo de resistência, além de ESBLs. Não foi observada resistência a tigeciclina (Figura 1).

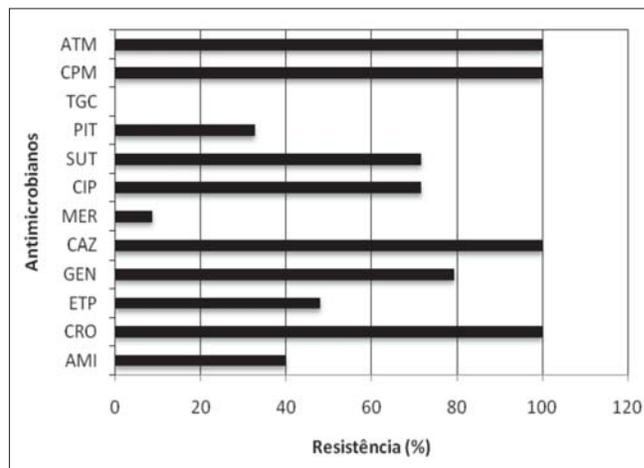


Figura 1. Perfil de resistência dos isolados produtores de ESBL. ATM (30 µg), aztreonam; CPM (30 µg), cefepime; TGC (15 µg), tigeciclina; PIT (110 µg), piperacilina/tazobactam; SUT (25 µg), sulfametoxazol/trimetoprim; CIP (05 µg), ciprofloxacina; MER (10 µg), meropenem; CAZ (30 µg), ceftazidima; GEN (10 µg), gentamicina; ETP (10 µg), ertapenem; CRO (30 µg), ceftriaxona; AMI (30 µg), ampicilina.

DISCUSSÃO

Métodos de triagem confirmatórios são rotineiramente utilizados para detecção de ESBLs em *E. coli* e *Klebsiella* sp. Com o aumento da ocorrência de ESBLs em outras enterobactérias, é necessário também avaliar a ocorrência em espécies que não-*E. coli* e não-*Klebsiella* sp. No presente estudo, a produção de ESBLs foi detectada em cinco gêneros diferentes de enterobactérias, além de *E. coli* e *Klebsiella* sp., mostrando a disseminação desse mecanismo de resistência na família *Enterobacteriaceae* (Tabela 1). A frequência de isolados produtores de ESBL entre as enterobactérias estudadas foi de 24,8%. Índices semelhantes foram reportados no Brasil por Mendes e colaboradores,⁽¹⁹⁾ que detectaram a presença de ESBLs em 29% das enterobactérias estudadas. Índices de detecção fenotípica de ESBLs de 51,4% entre enterobactérias já foram reportados por Schawber e colaboradores⁽²⁰⁾ em 53 hospitais norte-americanos. A alta frequência de ESBLs encontrada demonstra a importância de se pesquisar fenotipicamente a presença de ESBLs na rotina laboratorial, inclusive em espécies não-*E. coli* e não-*Klebsiella* sp.

Um estudo realizado no berçário do hospital geral de Fortaleza, no período de julho a dezembro de 2003, apresentou, entre as 225 hemoculturas analisadas neste período,

do, 16 positivas para *Klebsiella pneumoniae*, e, destas, 13 cepas foram produtoras de β -lactamases, representando um percentual de 81,25%.⁽²¹⁾

Como esperado, a espécie *E. coli* foi a principal produtora de ESBL entre as enterobactérias avaliadas, representando 50,2% dos isolados produtores de ESBL. Dentre as enterobactérias produtoras de ESBL, *Enterobacter* sp. foi responsável por 30,3%. É sabido que a diminuição na permeabilidade da bactéria aos antimicrobianos e a produção de outras β -lactamases induzíveis podem mascarar a presença de ESBL.^(8,22) Airpin e colaboradores⁽²³⁾ relataram que 49% dos isolados produtores de ESBL eram *E. aerogenes*, seguidos de 21% de *K. pneumoniae* e 15% de *E. coli*. O presente estudo mostrou diferença significativa quanto ao tipo de microrganismo isolado e a produção de ESBL ($p < 0,05$). O maior número de isolados produtores de ESBL ocorreu entre isolados de *E. coli* e *Enterobacter* sp., sendo que, para este último, a razão de chances foi de 8,43. Isso significa que, uma vez que o patógeno é identificado como *Enterobacter* sp., ele apresenta 8,43 vezes maior chance de ser produtor de ESBL.

Existem controvérsias a respeito da importância clínica de se reportar ESBL em espécies produtoras de β -lactamases cromossômicas induzíveis. As cefalosporinas de terceira geração são consideradas resistentes para esse grupo. Contudo, cabe a consideração de que o cefepime representa uma opção terapêutica para os microrganismos produtores de AmpC, ao passo que cepas produtoras de ESBL são resistentes.⁽²⁴⁾ No caso do *Proteus mirabilis*, a detecção é tão importante como em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, pois a espécie não possui β -lactamases cromossômicas conhecidas,⁽²⁴⁾ tendo sido padronizada recentemente pelo CLSI.⁽²⁵⁾ Além disso, a detecção é epidemiologicamente importante porque o gene de resistência está localizado em plasmídios facilmente dissemináveis.⁽¹³⁾

Sabe-se que os laboratórios que pesquisam cepas produtoras de ESBLs na rotina, ao confirmarem a produção desse mecanismo de resistência, independente do resultado obtido *in vitro*, automaticamente liberam os resultados de seus testes de sensibilidade, indicando que a cepa é resistente a todas as penicilinas, todas as cefalosporinas e aztreonam.⁽²⁵⁾

A terapia de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBLs é geralmente difícil, uma vez que esses microrganismos não são somente resistentes a penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, mas são frequentemente associados a resistência a outras classes de antimicrobianos.⁽²⁶⁾ As enterobactérias produtoras de ESBL avaliadas no presente estudo mostraram-se bastante suscetíveis aos carbapenêmicos, principalmente o meropenem. Uma forte associação entre produção de ESBL e resistência a

ciprofloxacina foi observada. Luzzaro e colaboradores⁽¹⁷⁾ relataram isolados com o gene tipo-*bla*_{TEM} caracterizados por resistência a ciprofloxacina e gentamicina em mais de 70% dos casos. De maneira geral, os dados do presente estudo suportam o uso de carbapenêmicos como terapia empírica em casos de infecções crônicas ou surtos nosocomiais. O uso de fluoroquinolonas poderia ser justificado somente em casos específicos de infecções associadas às ESBLs.

Excluindo os carbapenêmicos, amicacina e piperacilina/tazobactam foram os antimicrobianos mais efetivos *in vitro*, com suscetibilidades de 60,1% e 67,4%, respectivamente. Luzzaro e colaboradores⁽¹⁷⁾ encontraram perfis de suscetibilidade semelhantes e, nestes isolados, detectaram o gene tipo-*bla*_{SHV}. Também encontraram espécies de *P. mirabilis*, *P. stuartii* e *E. coli* com os genes tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{PER}. Baseado nesses dados, a piperacilina/tazobactam em monoterapia ou associada à amicacina pode ser uma opção útil para tratamento de infecções urinárias causadas por microrganismos suscetíveis. Como sugerido anteriormente, em infecções não crônicas e situações não de surto não é necessária a administração de carbapenêmicos. Essa medida pode auxiliar a preservar o valor dessas drogas. Como os isolados multirresistentes e produtores de ESBL deste estudo apresentaram altos índices de suscetibilidade a tigeciclina, esta poderia ser utilizada como opção para o tratamento de infecções específicas. O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso da tigeciclina no tratamento de infecções complicadas de pele e estruturas relacionadas e infecções intra-abdominais, e a droga pode ser utilizada em monoterapia para cobertura empírica de patógenos multirresistentes.⁽²⁷⁾ O principal argumento contra a expansiva disponibilidade desta droga é o potencial para o desenvolvimento de cepas resistentes. Além disso, existe uma preocupação de que a disponibilidade não restrita deste agente possa resultar que alguns antibióticos comumente utilizados, como fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos, tornem-se mais propensos a induzir resistência cruzada e causar danos colaterais em pacientes hospitalizados. Embora o fenômeno de coresistência não tenha sido observado até o momento, o potencial para o desenvolvimento de resistência a tigeciclina é desconhecido.^(7,14)

As diferenças significativas observadas com as diferentes unidades de internação não mostram relação com um tipo de paciente ou de procedimento médico específico, podendo ter ocorrido em função da alta taxa de circulação de pacientes nos postos de enfermagem avaliados.

CONCLUSÃO

Existem altas taxas de cepas produtoras de ESBL entre as enterobactérias isoladas do HSVP. *E. coli* e

Enterobacter sp. são as de maior preocupação. A detecção de produção de ESBLs na rotina laboratorial fornece embasamento que auxilia na seleção da terapia antimicrobiana apropriada. Com a disseminação de cepas produtoras de ESBL em hospitais ao redor do mundo, é necessário conhecer a prevalência de produção de ESBL para desenvolver uma política de terapia empírica em unidades de alto risco, onde os índices de infecção por esses microrganismos são elevados. Além disso, o conhecimento do padrão de resistência de cepas em uma área geográfica guia o uso correto e perspicaz de antimicrobianos. Há a possibilidade de que o uso restrito de um antimicrobiano leve a um retrocesso da pressão seletiva e bactérias resistentes não terão mais vantagem adaptativa nesses ambientes.⁽²⁸⁾ Assim, os índices de ESBL encontrados confirmam a preocupação mundial da emergência deste mecanismo de resistência.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Análises Clínicas e à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital São Vicente de Paulo por permitirem o desenvolvimento deste estudo. Ao Dr. Gilberto Barbosa da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar pelas sugestões ao longo deste manuscrito.

Abstract

The main resistance mechanism emerging in Enterobacteriaceae is represented by extended spectrum β -lactamase, enzymes capable of hydrolyzing expanded-spectrum-cephalosporins, which are very useful for antimicrobial chemotherapy of enterobacterial infections. Although resistance to these agents can show remarkable geographic variability, resistance rates are quite high in several countries. An observational, transversal, descriptive and retrospective study was developed to evaluate the frequency of ESBL among Enterobacteriaceae strains obtained from Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brazil. ESBL production was noted in 24,8 % (n = 208/838) of the isolates evaluated. Percentage of ESBL producers within species was highest in Escherichia coli 52,8 % (n = 110/208) followed by Enterobacter species 30,3 % (n = 63/208). Sensitivity of these isolates to meropenem was 91,4 % and piperacillin/tazobactam 67,4 %. The ESBL levels founded in this study confirm the world tendency of this resistance mechanism.

Keywords

ESBL; Enterobacterias; Bacterial resistance; Transversal study

REFERÊNCIAS

- Chaudhary U, Aggarwal R. Extended Spectrum β -lactamases (ESBL) - an emerging threat to clinical therapeutics. Indian J Med Microbiol. 2004 Apr-Jun;22(2):75-80.
- Amarante JMB. Prevalência de ESBL pode chegar até a 100% das Bactérias Isoladas em Hospitais. Fato Hospitalar. 2002;3:4-6.
- Boccia D, Stolfi I, Lana S, Moro ML. Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. Eur J Pediatr. 2001 Jun;160(6):385-91.
- Carson C, Narber KG. Role of fluorquinolones in treatment of serious bacterial urinary tract infections. Drugs. 2004;64(12):1359-73.
- Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Apr 1;165(7):867-903.
- Gupta A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit- Klebsiella pneumoniae. Semin Perinatol. 2002 Oct;26(5):340-5.
- Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, et al. Antibiotic coresistance in extended-espectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecyclin. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug; 50(8): 2695-9.
- Zar HJ, Cotton MF. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions. Paediatr Drugs. 2002; 4(2):73-83.
- Freitas ALP, Machado DP, Soares FSC, Barth AL. Extended-spectrum β -lactamases in Klebsiella spp and Escherichia coli obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. Braz J Microbiol. 2003;34:344-8.
- Lartigue MF, Zinsius C, Wenger A, Bille J, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Aug;51(8): 2855-60.
- O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of Proteus, Providencia and Morganella. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct;13(4):534-46.
- Pereira AS, Filho JRC, Tognim MCB, Sader HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de Klebsiella pneumoniae produtora de betalactamase de espectro estendido J Bras Patol Med Lab. 2003;39:301-8.
- Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol. 2004 Oct; 42(10):4769-75.
- Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect. 2003 Nov;47(4):273-95.
- Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo, Editora: Atheneu, 2005.
- Robin F, Delmas J, Schweitzer C, Tournilhac O, Lesens O, Chanal C, Bonnet R. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a single patient. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Apr;51(4):1304-9.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, et al. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. J Clin Microbiol. 2006 May; 44(5):1659-64.
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
- Mendes C, Hsiung A, Kiffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli C; Mystic Study Group. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. Braz J Infect Dis. 2000 Oct;4(5):236-44.
- Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE, Tenover FC. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-Escherichia coli and Non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):294-8.
- Menezes AE, Alencar AM, Cunha FA, Ângelo MRF, Salviano MNC, Nascimento IR; Frequência de cepas produtoras de enzima betalactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de Klebsiella pneumoniae em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza. Rev. bras. anal. clin. 2008;40(1):7-11.

22. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 May;49(5):2137-9.
23. Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Nov;47(11):3506-14.
24. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):557-84.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M 100-S 15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
26. Stein GE, Craig WA. Tigecyclin: a critical analysis. *Clin Infect Dis.* 2006 Aug 15;43(4):518-24.
27. Ku YH, Chuang YC, Yu WL. In vitro activity of tigeciclyne against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008 Aug;41(4):332-6.
28. Mathur P, Kapil A, Das B, Dhawan B. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacteria in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res.* 2002 Apr;115:153-7.

Correspondência

Daiane Bopp Fuentefria
Avenida Brasil Oeste, 888 – Centro
Passo Fundo, RS, Brasil
Fone/Fax +55-54-3312-2000

Avaliação de portadores assintomáticos de *Salmonella* em manipuladores de alimentos

Evaluation of asymptomatic *Salmonella* carriers in food handlers

Cátia Rezende¹

Eloni Aparecida Fontana²

Anne Caroline de Paula Freitas³

José Henrique Gonçalves Colletes³

Resumo

A *Salmonella* é uma enterobactéria patogênica ao homem e geralmente transmitida por alimentos contaminados. Os sintomas clínicos podem ser variados e estão relacionados com a patogenicidade da bactéria, com a quantidade presente no alimento e, conseqüentemente, com a ingerida e com a imunidade do paciente. Entretanto, existe uma parcela de pacientes que são assintomáticos e considerados potenciais transmissores, principalmente se este indivíduo exercer atividades que manipulam alimentos. Dentro deste contexto, o presente estudo objetivou pesquisar possíveis portadores de *Salmonella* spp em manipuladores de alimentos, pela metodologia laboratorial da cultura de fezes (coprocultura), considerada o método mais indicado para este diagnóstico, usando meios de enriquecimento selenito para crescimento de *Salmonella* sp. Foram analisados 52 voluntários manipuladores de alimento de uma rede de supermercado da cidade de Votuporanga. A pesquisa apresentou um caso positivo correspondendo a 0,52% do total analisado. Em artigos analisados foram encontrados positivities de até 100% em metodologias semelhantes, com diferencial na parte da coleta e na utilização de outros caldos de enriquecimento, o que pode explicar o baixo índice encontrado na pesquisa em questão.

Palavras-chave

Salmonella spp.; Assintomáticos; Alimentos; Manipuladores; Coprocultura

INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo⁽¹⁾ devido às suas características de endemicidade, alta mortalidade e, sobretudo, pela dificuldade de adoção de medidas no seu controle.⁽²⁾ O agente etiológico é a *Salmonella*, uma bactéria entérica que causa doenças em humanos e animais, por meio do consumo de água e alimentos contaminados, especialmente leite e vegetais crus, mariscos, ovos crus, carnes bovinas e suínas.⁽³⁻⁵⁾ A grande maioria dos sorotipos de *Salmonella* é patogênica ao homem, de forma que os sintomas clínicos podem ser variados.⁽⁶⁾

O quadro de infecção gastrointestinal é a manifestação mais comum da infecção por *Salmonella* e o episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos. Os principais sintomas são: dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais, que podem aparecer de 12 a 36 horas após a contaminação. Já os

sintomas mais graves incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos, comuns na febre tifoide (causada pela *Salmonella typhi*) e febre paratifoide (*Salmonella paratyphi*). Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de infecção.⁽⁴⁾

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo uma das principais causas de morbidade nos países da América Latina e Caribe.⁽⁷⁻⁹⁾ No Brasil, as doenças infecciosas, parasitárias e do aparelho digestório correspondem a 9,2% do total de casos de mortalidade, sendo as regiões do Norte e Nordeste brasileiro as mais afetadas.⁽¹⁰⁾

Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente casual no alimento incriminado, a ocorrência das Salmoneloses na população humana transmitida por alimentos é provavelmente subestimada.⁽¹¹⁾ Segundo Forsythe⁽¹²⁾ e Germano,⁽¹³⁾ somente 10% do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil, devido às falhas no sistema de notificação e de fiscalização.

Laboratório Didático de Análises Clínicas – Biomedicina – Centro Universitário de Votuporanga – SP, Brasil.

¹Farmacêutica-Bioquímica, Mestre em Biotecnologia, Professora Titular da Disciplina de Microbiologia Clínica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Votuporanga – SP, Brasil.

²Farmacêutica-Bioquímica, Mestre em Análises Clínicas, Professora Titular do Estágio Supervisionado em Análises Clínicas.

³Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Votuporanga – SP, Brasil

Artigo recebido em 07/07/2010

Artigo aprovado em 16/02/2016

Como esta patologia se dá pela transmissão fecal-oral através de alimentos contaminados, é de se esperar que a incidência seja mais elevada entre populações com grande densidade populacional, vivendo em precárias condições higiênicas sanitárias e socioeconômicas.⁽⁶⁾ A higiene dos alimentos abrange métodos na produção, no acondicionamento e na distribuição dos alimentos dentro dos limites de segurança microbiológico, abrangendo não somente as boas práticas pessoais dos manipuladores dos mesmos, mas também o emprego de utensílios e equipamentos para o seu preparo.⁽¹⁴⁾

Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais podem ser veiculadores de salmoneloses,^(14,15) mesmo sendo minimamente processados. Essa contaminação pode ocorrer pelo controle inadequado de temperatura, pelo contato com alimentos crus contaminados, principalmente de origem animal.^(8,9,14,16)

Nos últimos dez anos, surtos de DTA no mundo alertaram as autoridades sanitárias sobre a necessidade de readequar as medidas para controle de risco de transmissão, motivando os países a revisar as políticas para garantir que os alimentos consumidos pela população tenham condições sanitárias apropriadas.⁽¹⁷⁾ Recomendam-se ações de educação em saúde, destacando-se a lavagem correta das mãos entre manipuladores de alimentos e afastamento de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. da área de produção. Essas ações foram regulamentadas por autoridades de saúde pública em nível mundial.^(4,18)

A literatura apresenta várias pesquisas correlacionando a presença de *Salmonella* spp. em alimentos comercializados; entretanto, poucos estudos abordam a pesquisa de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp., importante via de contaminação alimentar.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em fezes de manipuladores de alimentos assintomáticos para salmonelose, utilizando meios seletivos para isolamento do agente causador e provas bioquímicas para identificação do gênero *Salmonella* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de voluntários

Manipuladores de alimentos, escolhidos aleatoriamente quanto ao sexo, idade, raça ou classe social foram utilizados no desenvolvimento deste estudo. Foram excluídos os que estavam utilizando antibióticos ou que terminaram a menos de quatro dias e/ou apresentavam quadros diarreicos recentes.

Inicialmente, os voluntários foram conscientizados sobre a importância da pesquisa e instruídos sobre a maneira correta da coleta e transporte de fezes. Esta etapa foi desenvolvida nas dependências dos estabelecimentos

que se interessaram na participação do estudo. Todos os voluntários participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo recebeu parecer favorável pelo CEP - Votuporanga (protocolo:016/2009).

Coleta de material biológico

As coletas foram realizadas no ambiente domiciliar de cada voluntário, pelos mesmos, e os materiais foram fornecidos pela equipe pesquisadora. Foi agendado o dia de recolhimento do material biológico (fezes). Neste dia, também, foram obtidas informações relativas aos voluntários, tais como: nome, idade, sexo e presença ou ausência de sintomas diarreicos.

As amostras clínicas (fezes) foram identificadas e transportadas utilizando-se o meio de transporte Cary & Blair, para o Laboratório Didático de Análises Clínicas do Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV). O transporte ocorreu em até 24 horas após emissão das fezes.

Metodologia laboratorial

A coprocultura (cultura de fezes) foi a técnica laboratorial desenvolvida no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário de Votuporanga, para a pesquisa de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp.

O swab contendo fezes acondicionadas no meio Cary-Blair foi inoculado nos caldos de enriquecimento Selenito e Tetracionato. Posteriormente, os tubos foram incubados por 12 horas em estufa bacteriológica a 35 +/- 1°C.

Transcorrido o período de incubação, os meios de enriquecimentos foram cultivados no agar SS (*Salmonella Shighella*) e VB (Verde Brilhante) pela técnica de esgotamento. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 35 +/- 1°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação foram feitas as análises macroscópicas e microscópicas das colônias. As colônias sugestivas de *Salmonella* spp. em agar SS e VB foram submetidas a provas bioquímicas. As características analisadas foram: colônias fermentadoras ou não fermentadoras de lactose com ou sem produção de H₂S (centro enegrecido) consideradas suspeitas e utilizadas na identificação; e colônias fermentadoras de lactose (rosas) e não fermentadoras (brancas), respectivamente.

O agar TSI foi a prova bioquímica utilizada para triagem de enterobactérias, incubado a 35 +/- 1°C por 24 horas. Após o período de incubação, os tubos de TSI que apresentaram as seguintes características: fermentação de glicose, H₂S positivo ou negativo e gás positivo ou negativo foram selecionados para provas bioquímicas de identificação: Citrato de Simmons, urease, triptofano desaminase, motilidade, indol e lisina. Após a leitura dessas provas bioquímicas pode-se confirmar a presença de *Salmonella* spp.

RESULTADOS

Neste estudo, 52 amostras de fezes de manipuladores de alimentos foram analisadas. Destes, somente um caso apresentou presença de *Salmonella* sp., correspondendo a 0,52%.

A faixa etária variou entre 18 e 47 anos com média de 29 anos. Das 52 amostras, 32 (61,53%) foram provenientes do sexo feminino e 20 (38,47%) do sexo masculino. A amostra positiva foi proveniente do voluntário do sexo masculino.

A amostra que apresentou presença de *Salmonella* spp. foi obtida por meio de enriquecimento Selenito com cultivo no agar SS. Essa mesma amostra não apresentou isolamento quando foi cultivada a partir do caldo Tetrationato nos meios SS e VB e do caldo Selenito cultivado no agar VB.

DISCUSSÃO

A *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica, responsável por surtos registrados em vários países.^(3,19) A salmonelose é uma das principais zoonoses na saúde pública em todo o mundo.⁽¹⁾ Entretanto, a maioria dos quadros transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem tratamento do agente causal no alimento incriminado, sendo que a ocorrência das salmoneloses é provavelmente subestimada.⁽¹¹⁾

As boas práticas de higiene pessoal dos manipuladores e a qualidade higiênico-sanitária da área de preparação dos alimentos permitem o consumo destes dentro dos limites de segurança microbiológica.⁽¹⁴⁾ A transmissão da *Salmonella* spp. para o homem geralmente ocorre pelo consumo de alimentos contaminados, pessoa a pessoa, no ambiente hospitalar ou, ainda, através de animais infectados.^(5,20-22)

Uma grande variedade de alimentos pode ser contaminada com *Salmonella* spp., sendo os mais suscetíveis: carnes (aves, suína e bovina), ovos, leite e derivados e frutos do mar.^(5,23) Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais também podem ser veiculadores de salmoneloses, devido à adoção de práticas de manipulação incorretas ou por contato com alimentos contaminados.^(14,16)

Os sintomas de salmonelose podem variar desde dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os episódios fatais. Já os sintomas mais graves incluem septicemia, febre alta, diarreia, e vômito, comum na febre tifoide e febre paratifoide, podendo levar a óbito.^(4,24)

Após o quadro de infecção gastrointestinal, o indivíduo pode se tornar portador desta bactéria sem necessariamente apresentar sintomas e transmitir esta bactéria ao manipular os alimentos. Pacientes podem se tornar portadores crônicos e continuar a excretar *Salmonella* nas fe-

zes por várias semanas. Recomendam-se ações de educação em saúde, destacando-se a lavagem correta das mãos e afastamento dos manipuladores de alimentos assintomáticos da área de produção.^(4,18)

Neste estudo foi encontrada baixa positividade – 0,52%. Resultado semelhante foi relatado por Kaku e colaboradores,⁽²⁴⁾ detectando somente três coproculturas positivas em 211 indivíduos analisados, num surto de salmonelose no noroeste do estado de São Paulo. Entretanto, em estudo desenvolvido por Peresi e colaboradores,⁽²⁵⁾ do total de 87 coproculturas processadas, 70 (80,5%) foram positivas para *Salmonella*. Estes estudos desenvolvidos no Brasil relataram presença de *Salmonella* em amostras fecais de pacientes com sinais e/ou sintomas de salmonelose, diferentemente do nosso estudo, que analisou amostras de fezes de indivíduos assintomáticos.

Silva e colaboradores,⁽⁸⁾ após uma investigação epidemiológica, forneceram evidências de que o surto por *Salmonella* ocorreu pela contaminação do alimento. O alimento pode ter contaminação durante o processo de produção, distribuição e armazenamento. Além disso, também sugeriram que um manipulador assintomático foi o responsável pela disseminação do patógeno para os alimentos. Costalunga & Tondo⁽²⁶⁾ indicaram que a contaminação do alimento por manipuladores infectados ocorreu em 2,37% dos casos analisados.

A legislação na avicultura brasileira cresceu e sofreu inúmeras mudanças nas duas últimas décadas, devido ao desenvolvimento do mercado interno e externo, associado ao fato de ser uma carne acessível à população. A implantação de um protocolo de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) objetivou um controle dos perigos biológicos da carne, contribuindo na qualidade da saúde do consumidor.⁽²⁷⁾ Entretanto, pouco se tem feito na legislação com relação à elaboração de protocolos para investigar portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. entre manipuladores de alimento e continuar assegurando a qualidade do alimento nesta etapa do processo.

Outra justificativa que indique baixa positividade de *Salmonella* nas amostras de fezes analisadas está relacionada com a metodologia laboratorial utilizada. Neste estudo foram utilizados os meios de enriquecimento Selenito e Tetrationato e os meios de isolamento SS e VB. Entretanto, Weiss e colaboradores⁽²⁸⁾ obtiveram 50% de positividade na amostras de fezes de suínos utilizando os meios de enriquecimento Tetrationato e Rappaport e os meios XLT4 e Rambach para isolamento. Pinto e colaboradores⁽²⁰⁾ analisaram amostras ambientais por meio do caldo Rappaport e Selenito para o enriquecimento e agar XLD e BPLS para isolamento. Desta maneira, a etapa de enriquecimento pode ter sido o diferencial para a grande variedade nos índices de positividade encontrados.

CONCLUSÕES

Com este estudo, pode-se concluir que, apesar de não ter sido encontrado um alto índice de positividade para *Salmonella* spp., um único foco pode se tornar fonte de uma grande disseminação do patógeno, acarretando um surto de infecções gastrointestinais. Para evitar tal disseminação, a melhor maneira de prevenção é o controle de manipuladores assintomáticos, o tratamento do manipulador infectado e o treinamento de boas práticas de higiene aos manipuladores de alimento.

Abstract

Salmonella is an enterobacteria pathogenic to humans and usually transmitted by contaminated food. The Clinical symptoms can be varied and are related to the pathogenicity of the bacterium, with the present in food and consequently with the intake and with the patient's immunity. However, there is a portion of patients who are asymptomatic, and as potential transmitters, especially if this individual performing activities that manipulations food. Within this context, this study aimed to investigate possible carriers of Salmonella spp. in manipulators of food, through the methodology of the laboratory culture of feces (stool culture), considered the best method for diagnosis using selenite enrichment media for growth of Salmonella spp. 52 volunteers were analyzed manipulator of food of a network of supermarket in the city of Votuporanga. The research showed a positive corresponding to 0.52% of total analyzed. In the articles analyzed were found positive to 100% on a similar methodology, with differential in the part of collection and use of other enrichment broths, which may explain the low index found in the research in question.

Keywords

Salmonella spp.; Assymtomatic; Food; Food handlers; Stool culture

REFERÊNCIAS

- Lourenço MCS, Reis EFM, Valls R. *Salmonella* entérica subsp houtenae sorogrupo O:16 em uma paciente HIV positivo : relato de caso. *Revista Instituto de medicina Tropical de São Paulo*. 2004;46(3):169-70.
- Guerin PJ, Vold L, Aavitsland P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. *Euro Surveill*. 2005 Mar;10(3):48-50.
- Majjala R, Ranta J, Seuna E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. *Food Control* 2005;16(8):669-75.
- Shinohara NKS, De Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima JLL. *Salmonella* spp, importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2008;13(5):1675-83.
- Suresh T, Hatha AA, Sreenivasan D, Sangeetha N, Lashmanaperumalsamy P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiol*. 2006 May;23(3):294-9.
- Connor BA, Schwartz E. Typhoid and paratyphoid fever in travelers. *Lancet Infect Dis*. 2005 Oct;5(10):623-8.
- Cardoso L. & Araújo, W.M.C. - Parâmetros de qualidade em produtos prontos para consumo imediato e congelados artesanais comercializados no distrito Federal no período de 1997-2001. *Higiene Alimentar*, 2003; 17(109):40-44.
- Silva CC, Rodrigues MM, Martins BR. Surto alimentar por *Salmonella typhimurium* associada a sanduíche de tomates secos e queijo branco, São Paulo, SP - Setembro de 2004. *Rev Net DTA*. 2004; 4:206-11.
- Silva CC, Rodrigues, MM, Martins BR. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em São Paulo/SP. *Boletim Epidemiológico Paulista* [periódico na Internet]. 2004 [acessado 2005 Abr 24]; 1(11). Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11_salmo.htm
- Brasil. Ministério da Saúde. Funasa. Cenepi. Mortalidade Brasil - 2004. Brasília: Cenepi/Funasa; 2004.
- Santos LR, Nascimento VP, Flores ML. *Salmonella* enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar* 2002;16(102/103): 93-9.
- Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed; 2002. 424 p.
- Germano PML. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Higiene Alimentar*. 1993;7(27): 6-11.
- Ukuku DO. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. *Food Microbiol*. 2006 May;23(3):289-93.
- Allende A, McEvoy JL, Luo Y, Artes F, Wang CY. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed 'Red Oak Leaf' lettuce. *Food Microbiol*. 2006 May;23(3):241-9.
- Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712 p.
- Organização Pan-Americana da Saúde. HACCP: instrumento essencial para a inocuidade de alimentos. Buenos Aires: OPAS/INPPAZ; 2001.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications For Foods. *Microrganismos de los alimentos*. Acribia: Zaragoza; 2002.
- Chávez-de la Peña ME, Higuera-Iglesias AL, Huertas-Jiménez MA, Báez-Martínez R, Morales-de León J, Arteaga-Cabello F, et al. An outbreak of *Salmonella* gastroenteritis among hospital workers. *Salud Publica Mex*. 2001 May-Jun;43(3):211-6. [Article in Spanish].
- Pinto UM, Cardoso RR, Vanetti MCD. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Rev. Nutr*. 2004;7(3):319-26.
- Silva EM, Duarte A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avic*. [online]. 2002;4(2):85-100.
- Wells SJ, Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA, Ferris K, Green A. Fecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farm and at cull cow markets. *J Food Prot*. 2001 Jan;64(1):3-11.
- Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Heck ME, Verbruggen A, Maas HM, Gastra W- Distribution of *Salmonella* enterica serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium phage type 90. *Vet Microbiol*. 2006 Mar 10;113(1-2):153-8.
- Kaku M, Peresi JTM, Tavechio AT, Fernandes AS, Batista AB, Castanheira IAZ, et al. Surto alimentar por *Salmonella* enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1995;29:127-31.
- Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev. Saúde Pública*. 1998;35(5):477-83.
- Costalunga S, Tondo EC. *Salmonellosis* in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;33:342-6.
- Carvalho LT, Costa PS, Carvalho, ALT. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na linha de produção de frango inteiro congelado. *Higiene Alimentar*. 2002;16(95):34-41.
- Weiss LHN, Nonig RB, Cardoso M, Costa M. Ocorrência de *Salmonella* spp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2002;22:104-8.

Correspondência

Cátia Rezende

Rua Pernambuco, 4196 – Centro
15500-006 – Votuporanga, SP

Bloco 6 - Laboratório Didático de Análises Clínicas
E-mail: catia_rezende@terra.com.br

Procalcitonina: uma nova ferramenta para o diagnóstico precoce e manejo da sepse - um estudo de casos em uma unidade de terapia intensiva

Procalcitonin: a new tool for early diagnosis and management of sepsis - a case study in intensive care unit

Agnaldo Gomes de Oliveira¹
Pedro Henrique de Jesus Diogo¹
Kássio Matos da Silva¹
Rayane Isabela de Sousa Batista¹
Daniel Thiago Mendes Silveira¹
William Khalil El Chaer²
Killarney Ataíde Soares²
Gilcilene Maria dos Santos El Chaer³

Resumo

A sepse é uma síndrome complexa causada pela resposta inflamatória sistêmica descontrolada do indivíduo, de origem infecciosa, caracterizada por manifestações múltiplas, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos e até o óbito. Um dos problemas na UTI é o diagnóstico precoce e a terapêutica apropriada da sepse, sendo um desafio diário nas unidades de emergências e de cuidados intensivos. Uma forma de minimizar os gastos e prevenir a resistência bacteriana é a dosagem de um novo marcador chamado de procalcitonina. Este trabalho objetivou evidenciar, por meio de descrição de casos clínicos, a eficácia da dosagem da procalcitonina como uma ferramenta no diagnóstico precoce para sepse, visando o uso racional de antibióticos. Realizou-se um estudo de casos em seis pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital São Francisco da Ceilândia, DF, com suspeita de infecção ou septicemia, no mês de janeiro de 2010. Neste período foram admitidos quarenta pacientes na UTI, sendo selecionados, aleatoriamente, seis para o presente estudo, que demonstrou a procalcitonina como um marcador de infecção bacteriana grave, propiciando diagnóstico precoce da sepse, distinção entre processo inflamatório e infeccioso, e quadros virais de bacterianos. Também auxilia o emprego adequado de antimicrobianos.

Palavras-chave

Sepse; Procalcitonina; Síndrome da resposta inflamatória

INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome complexa causada pela resposta inflamatória sistêmica descontrolada do indivíduo, de origem infecciosa, caracterizada por manifestações múltiplas, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou mesmo a morte do indivíduo.⁽¹⁾

Na última década ocorreram inúmeros avanços no entendimento da fisiopatologia desta síndrome, por meio de estudos multicêntricos, que resultaram da sugestão de alguns marcadores diagnósticos e no potencial benéfico de inúmeras alternativas terapêuticas.⁽²⁾

Tanto o diagnóstico precoce da sepse quanto a mudança ou interrupção do seu curso têm sido persistentemente perseguidos pelos pesquisadores nesses últimos anos. Entretanto, a má evolução clínica e/ou a manutenção

de elevada mortalidade nos pacientes com sepse ainda não sinalizam um desfecho próximo ao exitoso na busca de soluções para esse mal.

O uso do termo sepse não está restrito apenas à síndrome inflamatória sistêmica secundária à infecção bacteriana, mas àquela resultante de qualquer microrganismo e/ ou seus produtos (toxinas). O termo sepse é aplicável somente quando a resposta sistêmica é clinicamente relevante, podendo manifestar-se por uma variedade de situações de complexidade crescente: (a) sepse grave, entendida como sepse associada à disfunção de órgãos, hipoperfusão (que inclui, mas não está limitada à acidose láctica, oligúria ou uma alteração aguda do estado de consciência) e hipotensão; (b) choque séptico, entendido como sepse associada com as alterações da hipoperfusão mais a hipotensão persistente mesmo após ressuscitação volumétrica adequada; e (c) síndrome da disfunção de múlti-

¹Estudante de Graduação do curso de Farmácia da Faculdade JK/Anhanguera – Brasília, DF, Brasil.

²Coordenador do estágio em Análises Clínicas do curso de Farmácia da Faculdade JK/Anhanguera – Brasília, DF, Brasil.

³Professora das disciplinas de Citologia Clínica e Parasitologia da Faculdade JK/Anhanguera e Docente do curso de Medicina da Escola Superior de Ciências da Saúde da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde – ESCS-FEPECS – Brasília, DF, Brasil.

plos órgãos (SDMO), que pode representar o estágio final da resposta inflamatória sistêmica grave.⁽³⁾

Um dos problemas na UTI é o diagnóstico precoce e a terapêutica apropriada da sepse, apresentando assim um desafio diário nas unidades de emergências e de cuidados intensivos.⁽⁴⁾

A sepse apresenta uma ausência de sintomas e sinais clínicos não perceptíveis inicialmente. Sendo assim, muitos pacientes são diagnosticados com sepse e submetidos à antibioticoterapia de forma inadequada, podendo gerar gastos abusivos e desnecessários e contribuir para uma proliferação de microrganismos multirresistentes.⁽⁵⁾

Uma forma de minimizar os gastos inadequados e diminuir a resistência bacteriana é a dosagem de um novo marcador chamado de procalcitonina. A procalcitonina é o pró-hormônio da calcitonina, sendo uma proteína constituída de 116 aminoácidos com sequências idênticas às do proto-hormônio da calcitonina, produzidas pelas células C da glândula tireoide. Em indivíduos saudáveis, essa proteína está presente em concentrações muito baixas na circulação, permanecendo intrinsecamente nas células como principal peptídeo precursor da calcitonina.⁽⁶⁾ Em infecções bacterianas restritas a um órgão, em geral não se observa elevação significativa na concentração da PCT, mas nos processos bacterianos graves, com sepse, níveis extremamente elevados de procalcitonina intacta podem ser encontrados na circulação.⁽⁷⁾

Trabalhos recentes têm sugerido que, nesses casos, a produção é extratireoidiana, sendo que leucócitos, macrófagos, células monocíticas de vários órgãos como fígado, pulmão e intestino, além de células neuroendócrinas, têm sido responsabilizados pela síntese de PCT em resposta à infecção bacteriana.⁽⁸⁻¹¹⁾

Em condições fisiológicas normais, apenas uma quantidade de procalcitonina intacta está presente na circulação, sendo que a maior porção é secretada após proteólise. Existem algumas evidências que demonstram que a proteólise é suprimida pela ação de citocinas e endotoxinas, resultando na liberação da molécula intacta para a circulação.^(12,13) Adicionalmente está bem documentado que a transcrição do PCT RNAm é substancialmente aumentada por estímulos inflamatórios, justificando assim o resultado do aumento de sua síntese.⁽¹¹⁾

Vários estudos clínicos têm demonstrado a habilidade da PCT em detectar precocemente a sepse e em diferenciar processos bacterianos de processos virais.⁽¹⁴⁾ Portanto, pretende-se evidenciar, por meio da descrição de casos clínicos, a eficácia da dosagem da procalcitonina como uma nova ferramenta no diagnóstico precoce da sepse, visando o uso racional de antibióticos em prol da diminuição de cepas bacterianas multirresistentes e a diminuição de gasto nosocomial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de caso em seis pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital São Francisco da Ceilândia, DF, com suspeita de algum tipo de infecção ou septicemia, no mês de janeiro de 2010. Neste período foram admitidos quarenta pacientes na UTI, tendo sido selecionados seis para o presente estudo. Para melhor entendimento e análise dos dados, os pacientes foram classificados em escala numérica de 01 a 06.

O diagnóstico de septicemia foi baseado nos critérios estabelecidos pela Conferência de Consenso de 2001.⁽³⁾ Sepse foi caracterizada pela presença de sinais e sintomas de síndrome de resposta inflamatória sistêmica SRIS associada à infecção documentada ou suspeitada.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos por meio de consulta aos prontuários. Foram coletados dados relativos à dosagem da procalcitonina por ocasião da admissão do paciente na UTI, durante o seu seguimento e, finalmente, na suspensão da terapia, e demais dados relevantes acerca do diagnóstico clínico e laboratorial e evolução dos pacientes.

A procalcitonina foi mensurada por meio de metodologia ELFA (*Enzym Linked Fluorescent Assay*) no equipamento MiniVIDAS (BioMérieux). De acordo com o fabricante, uma concentração de PCT maior que 0,1 ng/mL pode assinalar a presença de uma infecção bacteriana clinicamente suspeita, que necessita de um tratamento antibiótico. Com uma concentração de PCT superior a 0,5 ng/mL, deve-se considerar um risco de desenvolvimento de sepsis severa e/ou choque séptico. A reabsorção da infecção séptica é acompanhada por uma diminuição da concentração de PCT para seus níveis normais com uma semivida de 24 horas.

Este estudo foi consentido e autorizado pelo centro de ensino e pesquisa do Hospital São Francisco, Ceilândia, DF.

RESULTADOS

Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes participantes do estudo

A) Paciente 01: sexo feminino, 23 anos, admitido na UTI no dia 04/01/2010 com diagnóstico inicial de nefrolitíase e choque séptico por pielonefrite aguda. Por ocasião da admissão, o valor da PCT foi de 58,9 ng/dL. Foi tratada com piperacilina + tazobactam 4,5g 6/6h D1/14, iniciando e permanecendo após segundo dia 2,5 g dia. Foram realizadas dosagens de PCT nos dias 04/01, 05/01, 06/01, 07/01, 08/01, 09/01, 10/01, 11/01, 12/01, 13/01, 14/01, 15/01, 16/01, 17/01, 21/01, cujos resultados respectivamente foram 58,9 ng/dL; 56,36 ng/dL; 56,69 ng/dL; 20,09 ng/dL; 6,59 ng/dL; 13,87 ng/dL; 12,80 ng/dL; 9,23 ng/dL; 5,13 ng/dL;

1,78 ng/dL; 0,87 ng/dL; 0,29 ng/dL; 0,10 ng/dL; 0,13 ng/dL; 0,05 ng/dL. Evoluiu favoravelmente com alta da UTI no dia 18/01, tendo permanecido aos cuidados da clínica médica até obtenção de alta hospitalar no dia 28/01/2010, visto que, no dia 21/01/2010, o leucograma estava altamente tocado com um valor de leucócitos 20.400 superiores ao do início da infecção, que era de 15.900.

B) Paciente 02: sexo feminino, 17 anos, admitida na UTI no dia 02/01/2010, com suspeita de infecção por H1N1 agravada por pneumonia atípica (PNM) e Insuficiência Pulmonar Aguda (IRPA). No ato da admissão na UTI apresentava uma PCT com valor de 71,39 ng/dL. Foi tratada com cloridrato de moxifloxacino 400 mg D1/10. Foram realizadas dosagens de PCT nos dias 03/01, 04/01, 05/01, 6/01, 07/01, 08/01, 09/01, 10/01, e 11/01, cujos resultados respectivamente foram: 32,39 ng/dL; 10,43 ng/dL; 5,93 ng/dL; 1,91 ng/dL; 1,68 ng/dL; 0,52 ng/dL; 0,20 ng/dL; 0,17 ng/dL; 0,12 ng/dL. Apresentou leucograma alterado no valor 17.000 mesmo após negatificação da PCT, havendo assim uma confiabilidade em se retirar o antimicrobiano. Evoluiu favoravelmente e teve alta da UTI no dia 15/01, sendo encaminhada aos cuidados da clínica médica.

C) Paciente 03: sexo masculino, 51 anos, admitido na UTI no dia 14/01 2010, com diagnóstico de apendicite e teve seu quadro agravado após a apendicectomia. O paciente desenvolveu processo inflamatório difuso e Insuficiência Renal Aguda (IRA). Por ocasião da admissão, o valor de sua PCT foi de 0,19 ng/dL, motivo pelo qual não se introduziu antibioticoterapia completa. Foram realizadas dosagens de PCT nos dias 15/01, 16/01, 17/01 e 18,01 cujos resultados, respectivamente foram 0,17 ng/dL; 0,20 ng/dL; 0,24 ng/dL; 0,15 ng/dL. O leucograma, que se encontrava com valor de 15.800 no momento em que apresentava valor mínimo de PCT, era de 0,14 ng/dL. Teve evolução favorável e teve alta da UTI no dia 20/01, sendo encaminhado aos cuidados da cirurgia geral, permanecendo por mais 10 dias internado na clínica cirúrgica, recebendo alta hospitalar no dia 30/01/2010.

D) Paciente 04: sexo masculino, 29 anos, admitido na UTI dia 31/01/ 2010 com quadro de hipertensão arterial (HAS) descompensada, suspeita de pneumonite por infecção viral (H1N1) e sangramento alveolar difuso. Evoluiu para insuficiência renal aguda (IRA). No momento da admissão apresentava uma PCT de 0,05 ng/dL. Não foi inserido esquema antibioticoterápico. Foi realizada outra dosagem de PCT no dia 01/02 cujo resultado foi de 0,08 ng/dL. Paciente evoluiu para óbito no dia 01/ 02.

E) Paciente 05: sexo feminino, 56 anos, admitido na UTI no dia 16/01/2010, com diagnóstico de obesidade, cardiopatia hipertensiva e pneumonite viral. Apresentava, no ato da admissão, PCT de 0,20 ng/dL. Foi realizada mais uma dosagem de PCT no dia seguinte à internação, a qual apresentou valor inferior de 0,14 ng/dl. Teve boa evolução

com alta para enfermaria. Courseou com melhora de seu quadro clínico. Uma semana depois, o valor de PCT foi de 0,08 ng/dL, tendo recebido alta hospitalar.

F) paciente 06: sexo masculino, 46 anos, admitido na UTI dia 15/ 01/ 2010 com diagnóstico de encefalopatia hepática + etilismo crônico + Insuficiência Renal Aguda (IRA) e Insuficiência Pulmonar Aguda (IRPA). No momento da admissão tinha um valor de PCT alterado de 36 ng/dL. Foi inserido esquema antibioticoterápico com cloridrato de moxifloxacino 400 mg D1/D7. Foram realizadas dosagens de PCT nos dias 16/01, 17/01, 18/01, 19/01 e 20/01, nos quais os resultados respectivamente foram 16 ng/dL; 8 ng/dL; 2,0 ng/dL; 0,6 ng/dL; 0,2 ng/dL. Teve evolução favorável com boa progressão da parte respiratória e recuperação neurológica e renal, deixando a UTI no dia 25/01/2010, sendo encaminhado à clínica médica, onde ficou por mais uma semana, tendo alta hospitalar.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo permitem algumas considerações importantes a respeito da PCT. Trata-se de uma importante ferramenta para o delineamento da terapia antimicrobiana. Todos os pacientes que tiveram elevação desta proteína foram submetidos à terapia antimicrobiana e tiveram seu quadro clínico e resposta terapêutica acompanhados por meio deste marcador.

A PCT é um marcador potente que auxilia no diagnóstico precoce da septicemia, a qual é caracterizada pela presença de bactérias no sangue associadas às doenças graves.⁽⁷⁾ Este exame possui algumas vantagens, sobretudo para melhor tratamento do paciente. O exame permite a suspensão do antibiótico antes do tempo empírico, em geral, cerca de cinco dias antes, minimizando o risco de resistência bacteriana, o risco de criação de germes multirresistentes e o tempo de internação.⁽¹¹⁾

A PCT também permite a melhor seleção do antibiótico, isto é, um menos potente para infecções menos severas e um mais potente para quadros mais graves. Desta forma, evita-se a introdução precoce de antibioticoterapia ou a não indicação deste tipo de terapia em casos desnecessários, e, se necessário, avalia-se a resposta do antibiótico utilizado visando manter ou não a conduta terapêutica adotada.⁽⁹⁾

Em todos os casos descritos neste estudo, a PCT demonstrou ser uma ferramenta indispensável no diagnóstico, na escolha do tratamento e decisão da conduta na terapêutica adotada.

Observou-se que a paciente 01, com diagnóstico de nefrolitíase e choque séptico por pielonefrite aguda e SDMO, apresentou uma PCT elevada no momento da admissão, o que demandou antibioticoterapia. A resposta satisfatória ao antibiótico foi comprovada pela queda pro-

gressiva da PCT até a sua negatificação, o que permitiu ainda um acompanhamento do quadro séptico da paciente e de possíveis recidivas. Desta forma, foi possível a inserção, manutenção e suspensão de forma adequada e em tempo correto do antibiótico, mostrando a importância da PCT no discernimento de uma infecção viral de uma bacteriana, promovendo diferenciação de um processo infeccioso de um inflamatório e a retirada segura do antimicrobiano. Estes dados corroboram com o estudo de Claeys et al.,⁽¹⁴⁾ que demonstraram a importância e a habilidade da PCT em detectar precocemente a sepse e em diferenciar processos bacterianos de virais.

A paciente 02 apresentava um quadro de infecção por H1N1, pneumonia atípica acompanhada de lrpA e infecção bacteriana não séptica. Apresentou a primeira dosagem de PCT muito elevada com queda progressiva até a sua negatificação. Foi empregada conduta terapêutica com boa resposta ao antibiótico, que pode ser comprovada por meio da redução da PCT e melhora clínica, dispensando assim o uso abusivo de antibióticos, embora seu leucograma tenha se mantido alterado mesmo após negatificação da PCT. Becker et al.,⁽⁶⁾ comprovaram, em seu estudo, a redução dos gastos com antibióticos e a diminuição da resistência bacteriana.

Já o paciente 03, que possuía um quadro de apendicectomia complicada, seguida de processo inflamatório difuso e IRA, apresentou uma PCT normal na admissão na UTI. Mesmo sem a administração de antibióticos, baseada na dosagem normal de PCT, embora o leucograma permanecesse alterado, o paciente evoluiu favoravelmente, comprovando que se tratava apenas de processo inflamatório. Poupança assim a utilização de antibiótico, otimizando gasto e evitando a exposição ao antibiótico e à resistência bacteriana. Estes estudos corroboram com Becker et al.,⁽⁶⁾ que demonstraram a importância de poupar o antibiótico evitando gasto desnecessário e resistência bacteriana.

O paciente 04, com diagnóstico de HAS e pneumonite por infecção viral por H1N1e sangramento alveolar difuso e IRPA, apresentou PCT normal, o que indicou se tratar de quadro viral, portanto não justificando a adoção de antibioticoterapia. A PCT se manteve dentro dos padrões normais, o que justificou a não introdução de antibióticos, mesmo com a evolução clínica desfavorável, que culminou em óbito. Este estudo está relacionado ao de Oberhoffer et al.,⁽¹⁵⁾ que afirmam estar a síntese de PCT substancialmente aumentada somente em processo infeccioso bacteriano.

Já a paciente 05, que veio transferida de outra unidade hospitalar, apresentava diagnóstico de obesidade, cardiopatia hipertensiva, suspeita de pneumonite por infecção viral e com a informação de ter iniciado o primeiro dia de antibiótico com o meropenem na unidade de onde fora

transferida. Por ocasião da admissão na UTI do Hospital São Francisco, embora com leucograma sugestivo, a dosagem de PCT foi normal, o que dispensou a utilização de antibiótico. Ficou evidenciado que o agente realmente era viral, já que a PCT permaneceu normal e a evolução clínica favorável propiciou a alta hospitalar subsequente. Este estudo está de acordo com o de Meisner,⁽¹⁶⁾ que afirma que administrações errôneas e inadequadas de antibióticos geram gastos abusivos e desnecessários e contribuem para o surgimento e proliferação de microrganismos multirresistentes.

O paciente 06, com diagnóstico de encefalopatia hepática, etilismo crônico, IRA e IRPA, apresentou um leucograma normal no ato da admissão, mas uma PCT elevada, o que sugeria sepse. A possibilidade de um diagnóstico precoce da sepse provavelmente constitui a maior utilidade da PCT, o que pode ser comprovado por meio da monitorização da evolução deste caso. Desta forma, introduziu-se precocemente a terapia antimicrobiana antes mesmo que o quadro clínico se agravasse. O paciente evoluiu favoravelmente com alta hospitalar alguns dias depois. De fato, Claeys et al.⁽¹⁴⁾ demonstraram em seu estudo a habilidade da PCT em detectar precocemente a sepse.

CONCLUSÃO

A descrição dos casos neste estudo permitiu concluir que a procalcitonina é um novo marcador de infecção bacteriana grave, possibilitando o diagnóstico precoce da sepse, a distinção de processo inflamatório de infeccioso, quadros virais de bacterianos, e principalmente o emprego adequado de antibiótico.

A dosagem de PCT também propicia a otimização dos gastos com antibióticos e o controle da resistência bacteriana.

APCT demonstrou assim constituir-se de uma ferramenta de extrema importância no diagnóstico preciso e precoce da sepse bacteriana, com ganhos relevantes no tratamento em unidades de terapia intensiva.

Como se trata de um novo marcador, ainda desconhecido por muitos, a experiência da UTI e do laboratório do Hospital São Francisco no que concerne à utilização da PCT na monitorização de seus pacientes, pode servir de modelo para outros hospitais e seguradoras de saúde.

Abstract

One of the problems faced in the Intensive Care Unit (ICU) is early diagnosis and appropriate treatment of sepsis. One way to minimize the inappropriate spending and reduce bacterial resistance is the determination of procalcitonin. Procalcitonin is a prohormone of calcitonin which rises considerably in the blood plasma in cases of serious bacterial infections. This study aimed to demonstrate, through description of clinical cases, the effectiveness of serum procalcitonin as a new tool in early diagnosis for sepsis, to encourage rational use of antibiotics in favor of the reduction of bacterial strains multiresistant

nosocomial and reduced spending. We conducted a case study in six patients admitted to the ICU of Hospital São Francisco da Ceilândia - DF, suspected of having some kind of infection or sepsis, in January 2010. In this period forty patients were admitted to the ICU, were randomly selected six for this study. The description of cases in this study showed that the procalcitonin is a new marker of severe bacterial infection, allowing early diagnosis of sepsis, the distinction of inflammatory process of infectious, viral infections of bacterial, and especially the appropriate use of antibiotics.

Keywords

Sepsis; Procalcitonin; Inflammatory response syndrome

REFERÊNCIAS

1. Carvalho PRA, Trotta Ede A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. J. Pediatr. (Rio J.) vol.79 suppl.2. Porto Alegre Nov. 2003.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31(4):1250-6.
4. Marc E, Ménager C, Moulin F, Stos B, Chalumeau M, Guérin S, et al. Procalcitonin and viral meningitis: reduction of unnecessary antibiotics by measurement during an outbreak. Arch Pediatr. 2002 Apr;9(4):358-64. [Article in French]
5. Meisner M. Procalcitonin (PCT): A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects, ISBN: 3-13-105473-5, Thieme Stuttgart, New York 2000.
6. Becker KL, Nysten ES, Snider R. La procalcitonine circule chez les sujets normaux. Annales Endocrinologie 1996; suppl. 1:59.
7. Andriolo A; Costa RP, Novo NF. Pró-calcitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves. Bras. Patol. Med. Lab. [online]. 2004;40(3):169-79.
8. Becker KL, O'Neil WJ, Snider RH Jr, Nysten ES, Moore CF, Jeng J, et al. Hyperprocalcitoninemia in inhalation burn injury: a response of the pulmonary neuroendocrine cell? Anat Rec. 1993 May; 236(1):136-8, 172-3.
9. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D; et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31:1250-6.
10. Becker KL, Nysten ES, Thompson K. Preferential hypersecretion of procalcitonin and its precursors in pneumonitis: a cytokine-induced phenomenon? Endotoxemia and Sepsis Congress, Philadelphia.
11. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, ET al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. J Lab Clin Med. 1999 Jul; 134(1):49-55.
12. Nylén ES, Snider RH Jr, Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. Am J Med Sci. 1996 Jul;312(1):12-8.
13. Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nysten ES, Snider RH, Simon GL, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Sep;83(9):3296-301.
14. Claeys R, Vinken S, Spapen H, Ver Elst K, Decochez K, Huyghens L, Gorus FK. Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. Crit Care Med. 2002 Apr.;30(4):757-62.
15. Oberhoffer M, Vogelsang H, Jäger L, Reinhart K. Katalcalcin and calcitonin immunoreactivity in different types of leukocytes indicate intracellular procalcitonin content. J Crit Care. 1999 Mar;14(1):29-33.
16. Meisner M1, Tschaikowsky K, Hutzler A, Schick C, Schüttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. Intensive Care Med. 1998 Jul;24(7):680-4.

Correspondência

Agnaldo Gomes de Oliveira
QNN 28, módulo "C" Área especial
72220-280 – Ceilândia, DF, Brasil
E-mail: agnaldohsf@gmail.com

Infecção urinária nosocomial no Hospital Universitário de Sergipe

Nosocomial urinary infection at University Hospital of Sergipe

Renata Hellen Silva Andrade¹
Jerônimo Gonçalves de Araújo²

Resumo

Objetivo: Conhecer os microrganismos presentes nas infecções do trato urinário nos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Sergipe. Observar prevalência dos microrganismos, fatores de risco e suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **Métodos:** Realizou-se um estudo transversal, descritivo, observacional, com base nos registros da CCIH do HU/UFS. No período de janeiro de 2009 a maio de 2010, houve um total de 24 uroculturas. **Resultados:** A sondagem vesical é o principal fator relacionado à ITU (54,16%), seguido do sexo feminino (41,6%), imunodepressão medicamentosa (12,5%) e *Diabetes Mellitus* (4,16%). O germe mais prevalente foi a *Escherichia coli* (33,3%), seguido por *Klebsiella pneumoniae* (25%) e *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%). *Enterococcus faecalis*, *Proteus penneri*, *Acinetobacter baumannii haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Staphylococcus epidermidis* representam 4,16% cada. As drogas eficazes contra os Gram negativos foram Amicacina, Imipenem e Gentamicina com, respectivamente, 19, 18 e 17 amostras sensíveis. Sulfametoxazol+Trimetropim apresentou elevado índice de resistência, 11 amostras. Fluoroquinolonas não tiveram um bom desempenho, 31,25% de resistência a levofloxacino e 30% a ciprofloxacino. **Conclusões:** A padronização das normas da CDC quanto à sondagem vesical se mostra importante para reduzir a principal causa de ITU. Os Gram negativos encontrados possuem grande resistência ao SMX-TMP e às fluoroquinolonas, porém os aminoglicosídeos se mostraram muito eficazes. Cefalosporinas também não são boas opções para o tratamento de ITU em nossa unidade.

Palavras-chave

Infecção urinária; Resistência bacteriana; Infecção urinária hospitalar; Urocultura

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) constitui um dos principais tipos de infecção hospitalar, sendo a presença de cateter urinário o principal fator de risco.^(1,2) A ITU hospitalar (ITUh) é responsável por aproximadamente 40% de todas as infecções hospitalares, sendo também uma das fontes importantes de sepse hospitalar.⁽³⁾ Outros fatores de risco associados à bacteriúria em pacientes cateterizados incluem: duração do procedimento, tipo de cateterização e do sistema de drenagem, terapia antimicrobiana, severidade do quadro que induziu à internação e doença de base.^(2,4)

A infecção do trato urinário relacionada à cateterização vesical (ITUc) é a infecção associada aos cuidados de saúde (IACS) mais comum nos Estados Unidos. IACS é a infecção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados e procedimentos de saúde prestados e que pode, tam-

bém, afetar os profissionais de saúde durante o exercício da sua atividade. A ITUc tem relação direta com a duração da cateterização, estando esse fator sempre presente em análises multivariadas. Entre os fatores de risco, este tem sido considerado o mais importante para o desenvolvimento de bacteriúria.^(5,6)

A condição predisponente mais comum nos pacientes com infecção de vias urinárias é um fluxo urinário comprometido mecânica ou funcionalmente, como obstrução da bexiga, estrangulamento da uretra, hipertrofia prostática, expansão do útero durante a gravidez, nefropatia diabética e poliomielite.⁽⁷⁾

As ITUs incidem com maior frequência em mulheres devido a alguns fatores intrínsecos ao aparelho feminino, como: extensão da uretra e colonização da região peri-uretral.⁽⁸⁾

Os agentes etiológicos de ITUs são, geralmente, provenientes da microbiota intestinal. Dentre os agentes mais

¹Doutoranda da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Sergipe – UFS – Aracaju, SE, Brasil.

²Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Sergipe – UFS. Especialização em Infectologia no Hospital Heliópolis – São Paulo, SP, Brasil. Professor Efetivo de Infectologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS – Aracaju, SE, Brasil.

comuns de bacteriúrias hospitalares estão *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Enterococcus* spp., sendo *E. coli* o mais frequente.⁽⁹⁾

A infecção do trato urinário é, provavelmente, uma das infecções que, com maior frequência, é tratada sem que haja certeza do diagnóstico.⁽¹⁰⁾

O objetivo deste estudo foi conhecer os microrganismos presentes nas infecções do trato urinário nos pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, observando a prevalência dos microrganismos, fatores de risco e sua suscetibilidade frente aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento da pesquisa

Inquérito transversal, descritivo, observacional, com base nos registros da CCIH do HU/UFS.

Durante o período de janeiro de 2009 a maio de 2010, foram avaliadas, de forma retrospectiva, 24 amostras de uroculturas positivas classificadas como IRAS (infecção relacionada à assistência à saúde) pela CCIH de pacientes internados no Hospital Universitário de Sergipe, sendo que todas foram incluídas no presente estudo pelo critério de interpretação baseado na contagem de bactérias, ou seja, com crescimento $\geq 10^5$ UFC/mL.

Os pacientes foram divididos por unidades de internação, tais como, Clínica Médica, UTI, Clínica Cirúrgica e Psiquiatria. Cada enfermaria citada abriga 40, 5, 42 e 8 leitos, respectivamente, num total de 95 leitos. Além destes, o hospital possui Enfermaria de Pediatria onde comporta 20 leitos, porém nenhum desses pacientes serviu de amostra para o estudo.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Sergipe em reunião realizada dia 07/05/2010, CAAE - 0002.0.107.000-10 (Anexo A). Após a aprovação, iniciou-se a coleta retrospectiva dos dados por meio das fichas de notificações da CCIH e dos prontuários desse atendimento.

As amostras foram urinas de jato médio. Os pacientes foram orientados para realizar uma higienização prévia na região genital, salientando-se estes cuidados principalmente no sexo feminino, onde o risco de contaminação é maior, desprezando-se o primeiro jato de urina e o restante da micção diretamente no frasco a ser realizada a urocultura. Também foi processada urina coletada com sonda vesical.

Em nossa unidade, a introdução das sondas vesicais é feita pelo profissional de Enfermagem com ensino superior. Ocasionalmente, os médicos residentes podem ser responsáveis por esse ato.

Foram incluídos no estudo os pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico de infecção do trato urinário (ITU) de origem hospitalar com urocultura positiva. Foram considerados como sintomas do trato urinário: disúria, polaciúria, tenesmo, urgência, retenção miccional, incontinência urinária associada ou não a sintomas gerais como febre, calafrios, prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal lombar. Foram excluídos do estudo, pacientes com ITU comunitária, portadores de balanopostite ou vulvovaginite, gestantes ou menores que 18 anos.

As amostras de urina foram coletadas em frascos estéreis, onde foram feitas as sementeiras em meio de cultura EMB e Cled, utilizando-se uma alça calibrada de 1 μ L). O agar EMB é utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos Gram negativos (*Enterobacteriaceae* e outros bastonetes Gram negativos) e o agar Cled permite o crescimento de microrganismos Gram positivos e Gram negativos presentes na urina. As culturas foram incubadas em estufa durante 24 horas, a 37°C. Foram consideradas positivas as urinas que apresentaram crescimento igual ou superior a 10^5 UFC/mL.

A identificação dos microrganismos e o teste de sensibilidade aos antibióticos foram feitos por meio automatizado, no aparelho Micro Scan, onde os níveis de resistência foram comparados com os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute/Nacional Committee For Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS 2007)*. Os dados obtidos foram associados com a idade, sexo e unidade de internação dos pacientes.

Depois da identificação do agente etiológico e do teste de sensibilidade aos antibióticos, o laudo era digitado para que o médico pudesse ter um melhor acompanhamento do quadro clínico.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2009 a maio de 2010, 3.269 pacientes foram admitidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS), 2.100 em 2009 e 1.169 até o dia 31 de maio de 2010. Desses, 18,35% (600) submeteram-se à urocultura. Trinta e duas culturas de jato médio de urina foram classificadas como infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) e constituíram a amostra inicial, da qual oito pacientes foram excluídos por causas diversas (Tabela 1). A amostra final foi constituída de 24 uroculturas que preencheram os critérios de inclusão.

Tabela 1- Motivos para exclusão no estudo

Motivo para exclusão no estudo	2009	2010 (até 31 de maio)
Paciente com menos de 18 anos	2	2
Urocultura não disponível	4	0
Total de excluídos	6	2

As uroculturas foram oriundas de três enfermarias com seus respectivos leitos de isolamentos e da UTI. Oito amostras foram provenientes da Clínica Médica, cinco da Clínica Cirúrgica, três da Psiquiatria e oito da UTI. Três pacientes ocuparam leitos de isolamento e sete necessitaram de internação hospitalar no último ano. Um paciente foi transferido diretamente de outro hospital (Hospital Nestor Piva) para o Hospital Universitário de Sergipe.

Os idosos foram responsáveis por 37,5% (9/24) do total, os demais tinham entre 18 e 59 anos. A maioria, 58,3% (14/24), era do sexo masculino. Pouco mais de 8% da amostra estudada evoluiu para o óbito durante a internação hospitalar, 8,3% (2/24). Nenhum dos óbitos teve como causa infecção do trato urinário. Dos 24 pacientes incluídos na amostra final, 13 (54,16%) adquiriram infecção do trato urinário por cateterização (ITUc), três por sondagem vesical de alívio e dez por sondagem vesical de demora. Destes, 40% (4/10) tiveram menos de 14 dias de sondagem e 60% (6/10), 14 ou mais dias.

O tempo da admissão até a coleta da urocultura também foi analisado. Sete uroculturas classificadas como IRAS foram realizadas em até 10 dias da admissão; de 11 a 20 dias, nove uroculturas; de 21 a 30 dias, duas uroculturas e a partir de 31 dias, seis uroculturas.

A análise de fatores de risco ratificou a sondagem vesical como principal fator relacionada à ITUu (54,16%; 13/24). Outros fatores considerados de risco para infecção do trato urinário encontrados nesta casuística foram: sexo feminino (41,6%; 10/24), imunodepressão medicamentosa (12,5%; 3/24) e *Diabetes mellitus* (4,16%; 1/24).

Considerando a presença de sintomas de infecção do trato urinário como sendo disúria, polaciúria, tenesmo, urgência, retenção miccional, incontinência urinária associada ou não a sintomas gerais como febre (>37,8°C), calafrios, prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal ou lombar, observou-se a presença de sintomas em 70,83% (17/24) dos casos. A febre foi o sintoma mais comum (45,83%; 11/24) seguido de disúria (41,6%; 10/24).

O germe mais prevalente foi a *Escherichia coli* (33,3%; 8/24), seguido por *Klebsiella pneumoniae* (25%; 6/24), *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%; 3/24). *Enterococcus faecalis*, *Proteus penneri*, *Acinetobacter baumannii/haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Staphylococcus epidermidis* representaram 4,16% (1/24) cada (Tabela 2).

Os perfis de sensibilidade foram analisados nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7. Estas estabeleceram o perfil de sensibilidade da *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, do gênero *Staphylococcus* e Gram negativos.

Nesse estudo, *Escherichia coli* demonstrou 100% de sensibilidade à amicacina e ao imipenem. Gentamicina também se comportou como uma droga sem muita resis-

Tabela 2- Perfil dos pacientes e uroculturas inclusos no estudo

Variáveis	n	%
Idade		
18 a 64 anos	17	70,9
Idade > 65 anos	7	29,1
Sexo		
Masculino	14	58,3
Feminino	10	41,7
Sondagem vesical		
Sonda vesical de alívio	3	23,1
Sonda vesical de demora	10	76,9
Duração da Sondagem vesical de demora(dias)		
Sondagem vesical de demora <13 dias	4	40
Sondagem vesical de demora ≥14 dias	6	60
Tempo da admissão à coleta da urocultura(dias)		
≤ 10 dias	7	29,2
11 a 20 dias	9	37,5
21 a 30	2	8,3
≥ 30 dias	6	25
Fatores de risco		
Sondagem vesical	13	54,2
Sexo feminino	10	41,6
Imunodepressão medicamentosa		
Diabetes mellitus	1	4,2
Presença de sintomas associados à ITUu		
Febre	11	45,8
Disúria	10	41,6
Patógeno		
<i>Escherichia coli</i>	8	33,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	4,2
<i>Proteus penneri</i>	1	4,2
<i>Acinetobacter baumannii/haemolyticus</i>	1	4,2
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	4,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	4,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	4,2

Tabela 3 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	Sensível	Intermediária	Resistente	ESBL ¹
Amicacina	8 (100%)	0	0	0
Amox-Clav ²	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0	0
Cefepime	3 (37,5%)	1 (12,5%)	4 (50%)	0
Ceftriaxona	4 (50%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)
Cefalotina	2 (33,3%)	0	4 (66,7%)	0
Ciprofloxacino	4 (50%)	0	4 (50%)	0
Gentamicina	7 (87,5%)	0	1 (12,5%)	0
Imipenem	8 (100%)	0	0	0
Levofloxacino	4 (50%)	0	4 (50%)	0
SMX+TMP ³	0	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0

¹ Extended-Spectrum Beta-Lactamases² Amoxicilina-Clavulanato³ Sulfametoxazol-Trimetopim

Tabela 4 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella pneumoniae*

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sensível	Intermediária	Resistente	ESBL ¹
Amicacina	5 (83,3%)	0	1 (16,7%)	0
Amox-Clav ²	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	0
Cefepime	4 (66,7%)	0	2 (33,3%)	0
Ceftriaxona	4 (66,7%)	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)
Cefalotina	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0
Ciprofloxacino	3 (50%)	1 (33,3%)	2 (16,7%)	0
Gentamicina	4 (66,7%)	0	2 (33,3%)	0
Imipenem	6 (100%)	0	0	0
Levofloxacino	4 (66,7%)	0	2 (33,3%)	0
SMX+TMP ³	3 (50%)	0	3 (50%)	0
Meropenem	1 (100%)	0	0	0

¹ Extended-Spectrum Beta-Lactamases² Amoxicilina-Clavulanato³ Sulfametoxazol-TrimetropimTabela 5 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível	Intermediária	Resistente	ESBL ¹
Amicacina	3 (100%)	0	0	0
Cefepime	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	0
Ciprofloxacino	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	0
Gentamicina	3 (100%)	0	0	0
Imipenem	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	0
Pip-Tazo ²	0	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)

¹ Beta-Lactamase induzida² Piperacilina-TazobactamTabela 6 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do gênero *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>	Sensível	Intermediária	Resistente	ESBL ¹
Linezilida	2 (66,7%)	0	1 (16,7%)	1 (33,3%)
Vancomicina	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	1 (33,3%)
Amp-Sulb ¹	1 (33,3%)	0	2 (33,3%)	2 (66,7%)
Oxacilina	1 (33,3%)	0	1 (16,7%)	2 (66,7%)
Rifampicina	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	1 (33,3%)
Ciprofloxacino	1 (33,3%)	0	2 (16,7%)	2 (66,7%)
Tetraciclina	1 (33,3%)	1 (33,3%)	2 (33,3%)	1 (33,3%)
Levofloxacino	1 (50%)	0	0	1 (50%)
SMX+TMP ²	2 (100%)	0	2 (33,3%)	0
Daptomicina	1 (100%)	0	3 (50%)	0
Ertapenem	0	0	0	1 (100%)

¹ Ampicilina-Sulbactam² Sulfametoxazol-Trimetropim

Tabela 7- Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de Gram negativos.

Gram negativos	Sensível	Intermediária	Resistente	ESBL ¹	IB ²
Amicacina	19(95%)	0	1(5%)	0	0
Amox-Clav ³	6(66,6%)	2(22,2%)	1(11,1%)	0	0
Cefepime	13(65%)	2(10%)	5(25%)	0	0
Ceftriaxona	10(62,5%)	0	4(25%)	2(12,5%)	2(12,5%)
Cefalotina	5(50%)	1(10%)	4(40%)	0	0
Ciprofloxacino	13(65%)	1(5%)	6(30%)	0	0
Gentamicina	17(85%)	0	3(15%)	0	0
Imipenem	18(94,7%)	0	1(5,3%)	0	0
Meropenem	1(50%)	0	1(50%)	0	0
Levofloxacino	11(68,75%)	0	5(31,25%)	0	0
SMX+TMP ⁴	4(25%)	1(6,25%)	11(68,75%)	0	0
Ampicilina	0	0	1(100%)	0	0
Amp-Sulb	2(100%)	0	0	0	0
Pip-Tazo ⁵	1(25%)	2(50%)	0	0	0
Ertapenem	1(100%)	0	0	0	0
Aztreonam	1(100%)	0	0	0	0
Cefotetan	1(100%)	0	0	0	0
Cefuroxime	1(100%)	0	0	0	0
Ticar/K.clav ⁶	1(100%)	0	0	0	0

¹ Extended-Spectrum Beta-Lactamases² Beta-Lactamase induzida³ Amoxicilina-Clavulanato⁴ Sulfametoxazol-Trimetropim⁵ Piperacilina-Tazobactam⁶ Ticarcilina-Clavulanato

tência, 87,5% de sensibilidade nas amostras analisadas. Sulfa-metoxazol associado a trimetropim teve grande percentual de resistência (87,5%).

Imipenem teve 100% de sensibilidade com a *K. pneumoniae*. Amicacina teve uma amostra resistente, porém 83,3% foram sensíveis. Com a *Klebsiella pneumoniae*, sulfametoxazol + trimetropim teve um desempenho de 50% de resistência. Nas uroculturas com antibiograma, os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) tiveram 100% de sensibilidade nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e ao imipenem teve uma amostra resistente (33,3%).

Com o gênero *Staphylococcus*, nenhum antibiótico teve 100% de sensibilidade nas três amostras. Os que mais se aproximaram foram linezilida, vancomicina e rifampicina; 66,7% de sensibilidade em três amostras. Quando analisados, daptomicina e sulfametoxazol + trimetropim foram sensíveis, respectivamente, em uma e duas amostras.

Quando agrupados em Gram negativos, as drogas mais eficazes foram amicacina, imipenem e gentamicina com, respectivamente, 19, 18 e 17 amostras sensíveis a estes. Sulfametoxazol + trimetropim foi o que mais apresentou resistência, 11 amostras no total. As fluoroquinolonas não tiveram um bom desempenho, 31,25% de resistência a levofloxacino e 30% a ciprofloxacino.

Foi encontrado perfil ESBL (*Extended Spectrum Beta-Lactamase*) tanto em amostra de *E. coli* como de *K. pneumoniae*.

DISCUSSÃO

Este estudo descreve as características dos pacientes e os principais patógenos causadores das ITU hospitalares no Hospital Universitário de Sergipe, bem como, o perfil de resistência aos antimicrobianos e fatores associados.

Neste estudo, a terceira idade representou 37,5% do total. A incidência de ITU aumenta com a idade, sendo que mulheres acima dos 65 anos apresentam maior taxa de hospitalização por pielonefrite do que os homens e mulheres mais jovens. Em idosos, as ITUs são a causa mais comum de bacteremia, sendo responsáveis por altas taxas de morbimortalidade. Nestes pacientes, a presença de ITUs prévias, o uso de cateteres vesicais de demora, outras doenças concomitantes, institucionalização e declínio do status cognitivo associam-se a piores prognósticos.^(11,12)

Neste estudo, o sexo masculino foi responsável por 53,8% das uroculturas relacionadas à ITU. Diferentemente, no estudo de Pavanello et al., evidenciou-se um predomínio de 60,5% do sexo feminino nos pacientes com ITU do Hospital Samaritano de São Paulo.⁽¹³⁾ Blatt et al. descreveram a prevalência de ITUs em relação ao sexo apresentando diferença significativa na análise estatística, com maior predominância do sexo feminino.^(7,14)

Dos 24 pacientes incluídos na amostra final, 13 (54,16%) adquiriram infecção do trato urinário por cateterização (ITUc). Três por sondagem vesical de alívio e dez por sondagem vesical de demora. Destes, 40% (4/10) apresentaram ITUc com menos de 14 dias de sondagem e 60% (6/10) com 14 ou mais dias. A chance de desenvolver ITU hospitalar cresce 5% por dia de cateterismo vesical. Oitenta por cento das ITUs são associadas a cateterização. Febre, pielonefrite, cálculos do trato urinário e inflamação renal crônica são algumas das outras complicações deste procedimento. A ITUc também prolonga a internação e aumenta o custo dos cuidados de saúde. Infelizmente, o uso inadequado e excessivo do cateter ainda persiste.⁽¹⁵⁾

Bhatia et al. encontraram uma frequência de cateterização inadequada menor (28,8%) quando comparado com estudos anteriores, nos quais estima-se que vão de 30% a 50%. Os fatores de risco associados à infecção do trato urinário foram idade > 60 anos, cateterismo de emergência e longa duração da cateterização (> 3 dias). Os pacientes idosos foram mais suscetíveis a todas as infecções e a ITUc não foi exceção.⁽¹⁵⁾ Apesar da identificação seletiva dos patógenos nas uroculturas, Nickel et al. relataram que, apesar de vários tipos morfológicos observados na colonização de cateteres urinários, apenas uma pequena

fração dos microrganismos poderia ser detectada pela cultura microbiológica tradicional.^(16,17)

No HU/UFS, a grande maioria dos germes identificados foram Gram negativos, correspondendo a 83,3% (20/24) das amostras encontradas neste estudo.^(18,19) Dentre os Gram negativos, foram encontrados *Escherichia coli* (33,3%; 8/24), seguidos por *Klebsiella pneumoniae* (25%; 6/24), *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%; 3/24), *Proteus penneri*, *Acinetobacter baumanniihaemolyticus* e *Yersinia pseudotuberculosis* 4,16% (1/24) cada. Três amostras tiveram cultura positiva para Gram positivos, sendo isolados *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* com 4,16% (1/24) cada. Dallacorte et al., analisando uma unidade hospitalar de geriatria do Rio Grande do Sul, encontraram elevado predomínio de *E. coli* em uroculturas (20/24).⁽¹²⁾ No estudo de Sadler et al., os Gram negativos também demonstraram ser os principais patógenos envolvidos em ITUs de origem hospitalar – *E. coli* (47,6%), *P. aeruginosa* (12,6%), *Klebsiella* spp. (9,8%) e *Enterobacter* spp. (5,8%).⁽²⁰⁾ Merle et al., avaliando a incidência de ITUs de origem hospitalar em pacientes internados em um Serviço de Urologia observaram que, dentre os microrganismos isolados, 23,9% foram *P. aeruginosa*, 20,4% *Enterococcus* spp., 13,4% *E. coli* e 11,1% *Staphylococcus aureus*.⁽²¹⁾

A principal espécie encontrada nas amostras de urocultura nesta casuística, *E. coli*, demonstrou grande resistência à associação sulfametoxazol + trimetopim e às fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), respectivamente 87,5% e 50%. *Escherichia coli* demonstrou 100% de sensibilidade a amicacina e imipenem. Gentamicina também se comportou como uma droga sem muita resistência, 87,5% de sensibilidade nas amostras analisadas. Moreno et al. afirmaram que, do total de 150 cepas de *E. coli* estudadas, 31 (21%) foram resistentes às quinolonas e 18 (12%) também foram resistentes às fluoroquinolonas, 44 (29,3%) eram resistentes ao sulfametoxazol + trimetopim.⁽²²⁾ Nicoletti et al. encontraram 27% de cepas resistentes a ciprofloxacino (94/345).⁽²³⁾ Correia et al., na unidade hospitalar de Bragança, em Portugal, citam prevalência de suscetibilidade da *E. coli* à amicacina em 93,3% e ao imipenem em 97,8% das amostras de pacientes internos.⁽²⁴⁾

A *Klebsiella pneumoniae* apresentou 33,3% de resistência às fluoroquinolonas e à ceftriaxona. A frequência de resistência às fluoroquinolonas da *Klebsiella* spp. foi de 33% e às cefalosporinas de terceira geração foi de 35%, no estudo de Tlamçani et al.⁽²⁵⁾

Foram encontradas duas amostras de bactérias Gram negativas com perfil ESBL, produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (8,3%; 2/24). Os principais produtores desta enzima são as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.⁽²⁶⁾

Alguns estudos têm revelado a existência de vários fatores de risco independentes entre si, associados à produção de ESBLs.⁽²⁷⁾ O principal fator, sem dúvida, está relacionado ao tempo de permanência do paciente nos hospitais, principalmente nos centros de tratamento intensivo (CTIs). Outro fator importante, em casos de hospitalização anterior, seria o uso de diversos antimicrobianos para erradicação da infecção, principalmente cefalosporinas de amplo espectro. Procedimentos invasivos, como cateteres urinários, também estão relacionados ao surgimento de ESBL.^(28,29)

O estudo no HU/UFS ratificou os fatores de risco, sendo encontrada sondagem vesical de demora e internamento hospitalar prévio no último ano. Todos os pacientes com bactérias com ESBL constatados na urocultura tiveram estadia na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e permanência maior que vinte dias no hospital.

A ampla e rápida distribuição geográfica das ESBLs é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro estão se deparando desde o início dos anos 80. As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal das cepas produtoras de ESBLs ou a disseminação através de genes produtores de ESBLs carregados por plasmídeos que são transmitidos entre gêneros diferentes de enterobactérias. Ambas, a disseminação por plasmídeos ou a própria multiplicação bacteriana, podem ocorrer concomitantemente. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o mesmo gene codificador tem sido encontrado em diferentes plasmídeos presentes em diferentes cepas.

Os Gram negativos isolados em urocultura de pacientes internos no HU/UFS mostraram inviabilidade no uso da associação de sulfametoxazol + trimetopim. As fluoroquinolonas e cefalosporinas de primeira, terceira e quarta geração não apresentam a eficácia almejada. Nesse estudo, verificamos a necessidade de buscar o isolamento do germe e seu perfil de sensibilidade no tratamento das ITUh. E salientamos o excelente perfil em relação à sensibilidade dos aminoglicosídeos frente aos patógenos causadores de infecção do trato urinário hospitalar, a despeito dos seus efeitos adversos e toxicidades. Os carbapenêmicos também são alternativa no tratamento de ITUh, porém não devem ser usados como primeira opção em todos os casos.

Apesar do estado de alerta quanto aos Gram negativos ESBL nesta unidade hospitalar, não houve evidência de MRPA (*multi-resistant P. aeruginosa*) nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* analisadas. O enterococo encontrado não apresentava resistência a vancomicina.

O isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados com bactérias multirresistentes são pontos cruciais no controle da disseminação de tais microrganismos no ambiente hospitalar. Além da separação física dos pacientes infectados ou colonizados por bactérias multirresistentes, devem-se tomar alguns cuidados du-

rante o contato com estes pacientes, tais como: atenção cuidadosa na antisepsia, além da utilização de vestimenta específica com objetivo de proteção individual.

É de fundamental importância a participação de todos os profissionais da área da saúde na adoção de medidas preventivas com relação às infecções urinárias de origem hospitalar, bem como em campanhas que estejam sempre voltadas para o uso racional de sonda vesical de demora ou, pelo menos, redução do tempo de sua utilização, além dos cuidados técnicos com o cateter visto que esse dispositivo constitui o principal fator de risco para ocorrência dessas infecções.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, e ao Dr. Jerônimo Araújo pelo apoio na conclusão desse projeto.

Abstract

Objective: To know the microorganisms present in urinary tract infections in patients treated at University Hospital of Sergipe, observing prevalence of microorganisms, risk factors and antimicrobial susceptibility. **Methods:** A cross-sectional study, descriptive, observational, based on records of the CCIH UH / FUS. From January 2009 to May 2010, the total was 24 urine cultures. **Results:** Catheterization is the main factor related to UTIh (54.16%, 13/24), followed by females (41.6%, 10/24), immunosuppression drug (12.5%, 3/24) and Diabetes mellitus (4.16%, 1/24). The germ was the most prevalent *Escherichia coli* (33.3%, 8/24), followed by *Klebsiella pneumoniae* (25%, 6/24), *Pseudomonas aeruginosa* (12.5%, 3/24). *Enterococcus faecalis*, *Proteus penneri*, *Acinetobacter baumannii*/ *haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Yersinia pseudotuberculosis* representing 4.16% (1/24) each. Drugs effective against Gram negative organisms were amikacin, imipenem and gentamicin with respectively 19, 18 and 17 sensitive strains. Trimethoprim - Sulfamethoxazole showed a large rate of resistance, 11 samples. Fluoroquinolones haven't had a good performance, 31.25% resistance to levofloxacin and 30% to ciprofloxacin. **Conclusions:** The standardization of the rules of the CDC regarding urinary catheterization proves important to reduce the main cause of UTI. The Gram negative bacteria have encountered great resistance to SMX-TMP and fluoroquinolones, but aminoglycosides were very effective. Cephalosporins are not good options for the treatment of UTIh in our unit.

Keywords

Urinary infection; Bacterial resistance; Hospitalar urinary infection; Uroculture

REFERÊNCIAS

1. Plowman R, Graves N, Esquivel J, Roberts JA. An economic model to assess the cost and benefits of the routine use of silver alloy coated urinary catheters to reduce the risk of urinary tract infections in catheterized patients. *J Hosp Infect.* 2001;48(1):33-42.
2. Kalsi J, Arya M, Wilson P, Mundy A. Hospital-acquired urinary tract infection. *Int J Clin Pract.* 2003;57(5):388-91.
3. Medeiros EAS, et al. Projeto Diretrizes: Prevenção da infecção hospitalar. Sociedade Brasileira de Infectologia, 2001.
4. Leone M, Albanese J, Garnier F, Sapin C, Barrau K, Bimar MC, Martin C. Risk factors of nosocomial catheter associated urinary tract infection in a polyvalent intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2003;29(7):1077-80.

5. Saint S, Meddings JA, Calfee D, Kowalshi CP, Krein SL. Catheter-associated urinary tract infection and the Medicare rule changes. *Ann Intern Med.* 2009 Jun 16;150(12):877-84.
6. Stamm AMN de F, Coutinho MSS de A. Infecção do trato urinário relacionada ao cateter vesical de demora: incidência e fatores de risco. *Rev Ass Med Brasil.* 1999;45(1):27-33.
7. Blatt JM, Miranda M do C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. *Revista Panamericana de Infectologia.* 2005;7(4):10-14.
8. Hochreiter WW, Bushman W. Urinary tract infection: a moving target. *World J Urol.* 1999;17(6):364-71.
9. Menezes EA, Carneiro HM, Cunha FA, Oliveira IRN, Ângelo MRF, Salviano MNC. Frequência de microrganismos causadores de infecções urinárias hospitalares em pacientes do Hospital Geral de Fortaleza. *Rev. bras. anál. clin.* 2005;37(4):243-6.
10. Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R. Infecções do trato urinário. *Microbiologia médica.* São Paulo: Manole; 2000. p.221-8.
11. Villas Bôas PJF, Luiz T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados. *Revista de Saúde Pública.* 2004 Jun;38(3):372-8.
12. Dallacorte RR, Schneider RH, Benjamin WW. Perfil das infecções do trato urinário em idosos hospitalizados na Unidade de Geriatria do Hospital São Lucas da PUCRS. *Scientia Medica, Porto Alegre.* 2007 out/dez;17(4):197-204.
13. Pavanello RS, Frota Mendonça CSH, Romero Aquino C, Soares da Silva AF, Malacchia JL, Campos Canesin A, et al. Principais Fatores de Risco para Infecção do Trato Urinário (ITU) em Pacientes Hospitalizados: Proposta de Melhorias. *Enfermeria Global.* 2009 Fev;15:1-6.
14. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas.* 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
15. Bhatia N, Daga MK, Garg S, Prakash SK. Urinary catheterization in medical wards. *J Glob Infect Dis.* 2010 May;2(2):83-90.
16. Frank DN, Wilson SS, Amand AL St, Pace NR. Culture-Independent Microbiological Analysis of Foley Urinary Catheter Biofilms. *PLoS One.* 2009;4(11):e7811.
17. Nickel JC, Downey JA, Costerton JW. Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. *Urology.* 1989 Nov;34(5):284-91.
18. Tenke P, Jackel M, Nagy E. Prevention and treatment of catheter-associated infections: Myth or reality? *EAU Update Series 2 (2004)* 106-15.
19. Silva N, Oliveira M, Bandeira AC, Brites C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006 Jun;10(3):191-3.
20. Sadder HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001 Aug;5(4):200-14.
21. Merle V, Germain JM, Bugel H, Nouvellon M, Lemeland JF, Czernichow P, et al. Nosocomial urinary tract infections in urology patients: assessment of a prospective surveillance program including 10,000 patients. *Eur Urol.* 2002 May;41(5):483-9.
22. Moreno E, Prats G, Sabaté M, Pérez T, Johnson JR, Andreu A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Feb;57(2):204-11.
23. Nicoletti J, Kuster SP, Sulser T, Zbinden R, Ruef C, Ledergerber B, Weber R. Risk factors for urinary tract infections due to ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a tertiary care urology department in Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2010 Jul 15;140: w13059.
24. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiologia da infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Med Port.* 2007;20:543-9.
25. Tlamçani Z, Ellaia K, Benomar A, Kabbaj H, Alaoui AE, Seffar M. Resistance to fluoroquinolone among *Klebsiella* spp strains producing extended-spectrum betalactamases isolated from urines. *Ann Biol Clin (Paris).* 2009 Sep-Oct;67(5):553-6. [Article in French].
26. Ostholm-Balkhed A, Tärnberg M, Nilsson M, Johansson AV, Hanberger H, Monstein HJ Nilsson LE. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and trends in antibiotic consumption in a county of Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2010 Dec;42(11-12):831-8.
27. Almeida MC, Simões MJS, Raddi MSG. Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007;28(2):215-9.
28. Husam Khanfar S, Khalid Bindayna M, Abiola Senok C, Giuseppe Botta A. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries* 2009;3(4):295-9.
29. Dalmarco EM, Blatt SL Córdova CMM de. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) - Revisão. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 2006;38(3):171-7.

Correspondência

Jerônimo Gonçalves de Araújo

Universidade Federal de Sergipe

Rua Claudio Batista, s/n Sanatório

49060-100 – Aracaju, SE, Brasil

Tel: (79) 21051807. Ramal: 1807 Fax: (79) 21051811

E-mail: jeronimo_araujo@uol.com.br

Diversidade microbiológica e suscetibilidade em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica diagnosticadas em Ponta Grossa, Paraná

Microbiological diversity and susceptibility in uropathogenic *Escherichia coli* strains diagnosed in Ponta Grossa, Paraná

Luís Antônio Esmerino

Resumo

As características microbiológicas e a suscetibilidade de 446 cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas de origem comunitária, diagnosticadas no município de Ponta Grossa, Paraná, foram estudadas. Com base nas características microbiológicas, as cepas foram classificadas em sete grupos: lactose positiva, lactose negativa, alfa hemolíticas, beta hemolíticas e três códigos de biótipos com frequência superior a 10%. Vinte e nove códigos de biótipos foram identificados e três com lactose positiva se destacaram representando cerca de 63,5% dos isolados. Observou-se que 27% das cepas não apresentaram nenhuma resistência e foram sensíveis aos 19 antimicrobianos testados e 8,9% foram resistentes para mais de três antimicrobianos entre os de primeira escolha. Cepas de *Escherichia coli* uropatogênica não fermentadoras da lactose foram 13,2% e essas cepas apresentaram menor suscetibilidade geral, onde a taxa de resistência frente às fluoroquinolonas foi o dobro (cerca 14%) quando comparada com a taxa de resistência geral que foi de 7%. Taxas de resistência <10% foram observadas para nitrofurantoína, gentamicina e norfloxacin, indicando que podem ser utilizados empiricamente e taxas de resistência >20% foram exibidas pela ampicilina, sulfametaxazol-trimetoprim e cefalotina indicando que o seu uso deve ter como referência o resultado do antibiograma.

Palavras-chave

infecção urinária; *Escherichia coli* uropatogênica; Antibiograma

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções bacterianas mais comuns encontradas na prática clínica, e *Escherichia coli* uropatogênica (ECUP) é o principal agente etiológico. Esse microrganismo é responsável por 70%-95% dos casos de ITU adquiridas na comunidade e em torno de 50% dos casos de infecção hospitalar.⁽¹⁾

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*.⁽²⁾ É uma bactéria extremamente heterogênea e complexa. Do ponto de vista de suas relações com o homem, podem-se distinguir três grandes grupos de amostras: i) um que habita os nossos intestinos (*E. coli* comensal); ii) outro que causa infecções intestinais (*E. coli* enteropatogênica); e iii) o grupo que causa infecções extra-intestinais (*E. coli* extraintestinal).

E. coli comensal não apresenta em seu genoma os genes que comumente codificam os fatores de virulência e difere das cepas patogênicas. Usualmente, *E. coli* comensal só causa infecção em inumodeprimidos ou quando encontra situações não fisiológicas, como o uso de cateteres implantados nas vias urinárias. O indivíduo normal raramente é infectado pela *E. coli* comensal.⁽³⁾

O grupo da *E. coli* enteropatogênica é constituído de seis grupos de importância médica: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC – *enteropathogenic E. coli*); 2) *E. coli* enteroinvasora (EIEC – *enteroinvasive E. coli*); 3) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC – *enterohemorrhagic E. coli*); 4) *E. coli* enteroagregativa (EAEC – *enteroaggregative E. coli*) e 5) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC – *enterotoxigenic E. coli*) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC – *diffusely adherent E. coli*).⁽²⁾

Professor Associado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, PR, Brasil.

Artigo recebido em 09/11/2010

Artigo aprovado em 16/02/2016

E. coli patogênica extraintestinal é formada por um conjunto de amostras que causam infecções por mecanismos comuns. As síndromes clínicas mais comuns são: ITU (*E. coli* uropatogênica), bacteremia (*E. coli* associada com sepse), e a meningite em neonatos (*E. coli* associada com meningite neonatal).⁽³⁾

ECUP é originária do intestino, e comparações através de técnicas moleculares mostram que esses microrganismos possuem características que os diferenciam de *Escherichia coli* comensal fecal. O fato de ECUP ser encontrada no intestino sugere que a transmissão ocorra através do ciclo oral-fecal. Técnicas moleculares mostraram também que a transmissão sexual é possível, uma vez que foram isoladas ECUP de parceiros de mulheres jovens com infecção urinária.⁽⁴⁾

A partir dos intestinos, ECUPs podem migrar e colonizar as regiões próximas da uretra. Oportunamente, entram na uretra, sobem para a bexiga e aderem aos receptores no epitélio vesical causando cistite. Mais raramente, a partir da bexiga, ECUPs podem ganhar os ureteres e chegar aos rins, desenvolvendo pielonefrite e, eventualmente, atravessar o epitélio, cair na corrente sanguínea e causar bacteremia.⁽³⁾

A urocultura é o exame microbiológico mais realizado em Laboratórios de Análises Clínicas, uma vez que as ITU estão entre as infecções mais frequentes. Em estudos onde o percentual de positividade das uroculturas foi avaliado observaram-se taxas variando entre 15,6% a 23%.⁽⁵⁻⁷⁾

A grande maioria das infecções urinárias é caracterizada pela presença de um número elevado de leucócitos na amostra (leucocitúria), sendo importante verificar, juntamente com a cultura, a contagem de leucócitos e a presença de microrganismos (bacteriúria).⁽⁸⁾

A ITU pode ser sintomática ou assintomática,⁽⁹⁾ e a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na urina é uma maneira de separar a contaminação de uma infecção. Os pacientes com infecção apresentam, geralmente, um único ou até dois microrganismos e cerca de $\geq 10^5$ UFC/mL, embora contagens de até $\geq 10^2$ UFC/mL de coliformes possam ser consideradas significativas em infecção aguda sintomática em mulheres.⁽¹⁰⁾

A metodologia adotada na maioria dos laboratórios consiste na inoculação de alíquotas do material em placas, com o auxílio de uma alça calibrada de 1 μ L ou 10 μ L, para a quantificação das UFC/mL e posterior identificação bacteriana baseada em provas bioquímicas. AECUP cresce rapidamente (18 a 24 horas) em meios geralmente utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica, tais como agar CLED (agar cistina-lactose-deficiente em eletrólitos) e agar MacConkey. O agar CLED pode ser substituído pelo agar sangue e o agar MacConkey pelo agar EMB (agar eosina-azul de metileno).⁽²⁾

A identificação das enterobactérias baseia-se principalmente na presença ou não de diferentes enzimas codificadas pelo material genético dos cromossomos bacterianos. Essas enzimas participam do metabolismo bacteriano em diversas vias que podem ser detectadas por meios especiais utilizados em técnicas de cultivo *in vitro*.⁽¹¹⁾ O processo desde a semeadura da urina em placa até a identificação bacteriana demora no mínimo 48 horas. Em alguns casos, a identificação requer provas adicionais para confirmação, o que poderá adiar o laudo final para até 72 horas.⁽⁵⁾ Após ou juntamente com a identificação bioquímica é realizado o antibiograma.

Embora *Escherichia coli* seja uma bactéria de fácil identificação no laboratório de microbiologia clínica, observamos no dia-a-dia que essa bactéria é muito complexa e apresenta diferentes características microbiológicas devido ao seu crescimento em placas e diferentes códigos de biótipos que são identificados por meio da utilização de provas bioquímicas. Dessa forma, pensou-se em realizar esse trabalho com o objetivo de estudar as diferentes características microbiológicas de *Escherichia coli* uropatogênica diagnosticadas no município de Ponta Grossa, Paraná e comparar sua suscetibilidade frente aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 446 cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas de origem comunitária. As cepas, previamente identificadas como *Escherichia coli*, foram congeladas a -20° C em caldo BHI com 15% de glicerol. Posteriormente, no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, as cepas foram repicadas em agar sangue de carneiro a 5%, agar CLED (cistina-lactose-eletrólito deficiente) e agar MacConkey. Em agar sangue observou-se o tipo de hemólise, e a capacidade de utilização da lactose foi observada em agar CLED e agar MacConkey. A identificação dos biótipos de ECUP foi realizada pela combinação de provas bioquímicas específicas utilizando-se um Manual de Identificação de Enterobactérias.⁽¹²⁾ Para identificação trabalhamos com uma probabilidade de 90%.⁽²⁾ Utilizou-se o meio de Rugai modificado, que fornece as provas bioquímicas de LTD (L-triptofano-desaminase), H₂S (gás sulfeto), fermentação da glicose com ou sem produção de gás. O meio de TSI (tríplice-açúcar-ferro) foi utilizado com a finalidade de ajudar nas provas de fermentação da lactose e produção de gás da glicose. O meio MIO (movimento-indol-ornitina) forneceu as respectivas provas. Os testes de lisina, citrato e rhamnose completaram a série bioquímica. Cada prova positiva ou negativa propicia um número e o somatório caracteriza um código de biótipo. Posteriormente, a consulta desse código no Manual fornece o

percentual relativo à bactéria encontrada.⁽²⁾ Quando o biótipo não se aproxima dos 100%, algumas provas adicionais são sugeridas pelo Manual para confirmação bacteriana.⁽¹²⁾

Para cada cepa identificada determinou-se sua suscetibilidade pelo método de disco-difusão em agar Müller-Hinton utilizando-se o preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCLI).⁽¹³⁾ Os antimicrobianos testados foram divididos em dois grupos. No grupo A foram incluídos os agentes que rotineiramente devem ser testados e relatados como: ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, gentamicina 10 µg, tobramicina 10 µg, norfloxacin 10 µg, nitrofurantoína 300 µg, ácido nalidíxico 30 µg e sulfametoxazol-trimetoprim 23,75/1,25 µg. No grupo B foram incluídos os agentes que devem ser testados e relatados seletivamente, como amoxicilina-ácido clavulânico 20/10 µg, ampicilina-sulbactam 10/10 µg, piperacilina-tazobactam 100/10 µg, cefepima 30 µg, cefoxitina 30 µg, cefotaxima 30 µg, ceftriaxona 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, imipenem 10 µg, aztreonam 30 µg, ceftazidima 30 µg. Os antibiogramas foram realizados em duas placas com média de dez discos por placa.

Para a pesquisa de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) foi inicialmente realizado o teste de triagem. No teste de disco-difusão (antibiograma), amostras de ECUP que apresentaram halos de inibição ≤ 27 mm para aztreonam, ≤ 27 mm cefotaxima, ≤ 25 mm ceftriaxona e ≤ 22 mm ceftazidima foram consideradas suspeitas de produzirem ESBL.⁽¹³⁾ Para essas cepas foram realizados os testes do disco de aproximação e disco combinado para confirmação.⁽⁸⁾

Os níveis de sensibilidade foram relatados utilizando-se o percentual de cepas sensíveis aos antimicrobianos testados e cepas com sensibilidade intermediária foram consideradas resistentes. Para o controle de qualidade do antibiograma, com o objetivo de avaliar a metodologia e a qualidade dos discos, utilizou-se uma cepa de referência, *Escherichia coli* ATCC 25922.

RESULTADOS

O estudo, com base nas características microbiológicas, determinou sete grupos de ECUP: lactose positiva, lactose negativa, alfa hemolíticas, beta hemolíticas e três códigos de biótipos com frequência superior a 10%.

A classificação, tendo como referência o comportamento bioquímico de ECUP, mostrou 29 códigos de biótipos (Tabela 1). Os dados da frequência de ocorrência dos biótipos e a probabilidade de ser *Escherichia coli* foram obtidos no Manual de Identificação de Enterobactérias. Em 360 cepas (80,7%), a identificação bioquímica satisfatória foi realizada pelo meio das reações padronizadas e, em 86 cepas (19,3%), foram necessárias reações adicionais

Tabela 1 - Diferentes códigos de biótipos de *Escherichia coli* uropatogênica

Código Biotipo	N	Frequência (%)	Probabilidade de ser <i>E. coli</i> (%)	Ocorrência conforme Manual
0761	4	0,90	100	3345/1
0781	3	0,67	99,55	1801/1
0791	1	0,22	96,45	1104/1
0861	3	0,67	98	1420/1
0961	9	2,02	100	291/1
0971	4	0,90	99,93	178/1
0980	1	0,22	99	822/1
0981	9	2,02	99,78	157/1
0991	25	5,61	98,24	96/1
2681	1	0,22	99,65	366/1
2761	4	0,90	100	139/1
2781	4	0,90	99,98	75/1
2791	5	1,12	99,85	46/1
2861	11	2,47	98	59/1
2870	1	0,22	100	190/1
2871	1	0,22	98	36/1
2881	5	1,12	98,74	32/1
2891	5	1,12	99	20/1
2921	1	0,22	98	157/1
2960	9	2,02	98,09	64/1
2961	51	11,43	100	12/1
2970	6	1,35	98,13	39/1
2971	41	9,19	99,96	7/1
2980	4	0,90	99,97	34/1
2981	82	18,39	99,96	7/1
2990	4	0,90	99,81	21/1
2991	150	33,63	99,74	4/1
3961	1	0,22	99,99	230/1
6971	1	0,22	100	17650/1
Total	446	100	-	-

como: celubiose, ureia, Voges-Proskauer, arabinose, adonitol e malonato.

O padrão de hemólise tipo alfa (α), em agar sangue de carneiro, foi observado em 76% das ECUP com 27 códigos de biótipos, e 24% das cepas apresentaram hemólise tipo beta (β) com 14 códigos de biótipos.

O estudo do perfil de suscetibilidade das 446 cepas de ECUP frente aos antimicrobianos do grupo A (Tabela 2) mostrou as maiores taxas de suscetibilidade para a tobramicina (97,5%) e nitrofurantoína (97,3%) e as menores taxas para ampicilina (40,6%) e com a associação sulfametoxazol-trimetoprim (46,1%).

Para os antimicrobianos do grupo A observou-se que 120 cepas (26,9%) apresentaram suscetibilidade para todos os antimicrobianos testados, 62 cepas (13,9%) mostraram resistência simples (para um antimicrobiano) e 264 cepas (59,2%) apresentaram multirresistência, sendo resistente para dois ou mais antimicrobianos. A multirresistência para dois antimicrobianos ocorreu em 132 cepas (29,6%), para três, em 93 cepas (20,9%), para quatro, em 32 cepas (7,2%), para cinco, em seis cepas (1,3%) e para seis, em uma cepa (0,2%). Nenhuma das cepas apresentou resistência para os oito antimicrobianos testados neste grupo.

Na pesquisa de ESBL, o resultado do teste de triagem mostrou que 22 cepas (4,9%) apresentaram diâmetros indicativos, e a produção de ESBL foi confirmada em duas cepas (0,5%).

Com relação aos antimicrobianos do grupo B (Tabela 2), as menores taxas de suscetibilidade foram observadas com a associação amoxicilina-ácido clavulânico (83,6%) e ampicilina-sulbactam (88,7%), e a maior taxa, com imipenem (100%).

DISCUSSÃO

Neste estudo, o comportamento bioquímico da ECUP mostrou-se diversificado e 29 códigos de biótipos foram detectados (Tabela 1). Variações nas características populacionais e geográficas são descritas como fatores que contribuem para a diversidade comumente descrita em populações de ECUP, e essa diversidade tem dificultado a detecção da emergência e da circulação de linhagens patogênicas.⁽⁴⁾

Para a identificação, através de provas bioquímicas e enzimáticas, trabalhou-se com uma probabilidade de 90%, por ser esse percentual considerado satisfatório para os laboratórios de microbiologia clínica.⁽²⁾ Na maioria das provas bioquímicas, a leitura foi efetuada em 24 horas, exceto para lactose, que foi em 48 horas. Algumas cepas podem utilizar a lactose tardiamente, e o tempo máximo de 48 horas foi utilizado por ser esse tempo o que geralmente se leva para emitir um laudo de urocultura em um laboratório de análises clínicas.

A probabilidade de ser *Escherichia coli* pela leitura combinada de provas bioquímicas na maioria dos casos foi $\geq 98\%$ (Tabela 1). Cerca de 95% das cepas de *E. coli* utilizam a lactose⁽²⁾ e aproximadamente 10% das *Escherichia coli* uropatogênicas são lactose negativa.⁽⁵⁾ Cepas de ECUP lactose negativa são reconhecidas na cultura por produzirem colônias azul-esverdeadas em agar CLED enquanto que as lactose positivas produzem colônias amarelas. Neste estudo, a lactose foi positiva em 387 cepas (86,8%) e observaram-se vinte (20) códigos de biótipos. Os mais frequentes foram o 2991, o 2981 e o 2961, sendo

que, juntos, representaram 63% dos isolados. O biótipo 2991 apresentou frequência de 33,63% e, segundo o Manual de Identificação de Enterobactérias,⁽¹⁴⁾ apresenta ocorrência de uma em cada quatro (1/4) *Escherichia coli*; o biótipo 2981 apresentou frequência de 18,39% e ocorrência de 1/7 e difere do anterior pelo movimento negativo. O biótipo 2961 apresentou frequência de 11,43% e ocorrência de 1/12. A lactose foi negativa em 59 cepas (13,2%) e observaram-se nove (9) códigos de biótipos, sendo o mais frequente o 0991 (5,91%) com ocorrência de 1/96. Os demais biótipos foram observados com frequência inferior a 10% (Tabela 1).

O padrão de hemólise alfa tem sido relatado como predominante em cepas de ECUP.⁽¹⁵⁾ A hemólise é causada por uma toxina (hemolisina) que pode ser produzida tanto por um plasmídeo quanto pelo cromossomo da bactéria. No processo, a bactéria obtém o ferro, que é um nutriente essencial para a viabilidade da bactéria. Na *Escherichia coli*, o transporte do ferro através da membrana externa e a sua liberação no citoplasma é mediado por sideróforos.⁽¹⁶⁾

O estudo da suscetibilidade de ECUP frente aos antimicrobianos do grupo A mostrou maior sensibilidade para a tobramicina (97,5%) seguida da nitrofurantoína (97,3%), gentamicina (96,6%), e norfloxacin (93,1%), todas consideradas altas (Tabela 2). Resultados semelhantes foram relatados para gentamicina, nitrofurantoína e norfloxacin.⁽¹⁷⁾ Para a cefalotina, a taxa de suscetibilidade foi de 69,3% (moderada). A suscetibilidade frente à cefalotina pode ser utilizada para prever a atividade de outras cefalosporinas, como cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor e cefadroxil.

Cefalosporinas atingem níveis urinários mais elevados e são boas opções terapêuticas para o tratamento das infecções urinárias em gestantes.⁽¹⁴⁾ Neste estudo, a sensibilidade para a cefalotina (69,3%) foi moderada. Boa sensibilidade para cefuroxima (95,5%) tem sido relatada em outros estudos.^(18,19) Talvez fosse importante incluir nos antibiogramas dessas pacientes duas ou mais cefalosporinas de primeira geração, considerando a importância do uso dos antibióticos beta-lactâmicos na gravidez.^(19,20)

As taxas de suscetibilidade observadas com a ampicilina e com a associação sulfametoxazol-trimetoprim estão entre as mais baixas relatadas para ECUP.^(11,17,21,23) Neste trabalho elas não foram diferentes, e taxas de 40,6% e 46,1% foram observadas com a ampicilina e com a associação sulfametoxazol-trimetoprim, respectivamente (Tabela 2).

Estudos mostram que, quando a taxa de prevalência de resistência frente a um determinado antimicrobiano chega a 10%-20%, é razoável considerar a utilização de um outro agente.^(24,25) A resistência observada *in vitro* pode resultar em falha terapêutica entre 50% a 60%.⁽²⁶⁾ Assim, a taxa de resistência de 15,2% para ácido nalidixico mostra

Tabela 2 - Suscetibilidade de *Escherichia coli* uropatogênicas diagnosticadas em Ponta Grossa, Paraná

AGB	Grupo	Lactose Positiva	Biótipo 2991	Biótipo 2981	Biótipo 2961	Lactose Negativa	Hemólise Alfa	Hemólise Beta	Geral
AMP	A	40,8	42,7	40,2	43,1	40,0	42,0	38,6	40,6
CFL	A	70,3	64,0	73,2	82,4	62,7	68,9	78,1	69,3
GEN	A	97,2	99,3	96,3	94,1	93,2	97,0	96,9	96,6
TOB	A	98,1	98,0	98,7	98,0	92,9	98,5	96,8	97,5
NOR	A	94,1	94,0	94,0	90,2	86,4	90,5	97,9	93,1
NAL	A	85,1	85,2	87,5	82,4	82,8	80,3	94,7	84,8
NIT	A	96,5	97,3	96,3	94,1	98,3	96,7	99,0	97,3
SXT	A	44,5	43,0	45,7	47,1	55,9	47,0	45,8	46,1
AMC	B	83,7	79,3	80,5	92,2	82,8	85,9	82,1	83,6
SAB	B	88,8	88,1	86,3	90,2	89,7	89,5	88,5	88,7
PPT	B	96,9	96,0	97,5	98,0	100	98,0	95,8	97,3
CPM	B	99,3	98,7	100	100	100	99,3	99,0	99,3
CFO	B	100	100	100	100	100	100	100	100
CTX	B	99,1	98,8	99,3	100	100	99,0	98,9	99,1
CRX	B	99,5	99,3	100	100	100	99,7	99,0	99,5
CIP	B	94,0	94,1	93,8	90,0	86,2	90,5	97,9	93,0
IMP	B	100	100	100	100	100	100	100	100
ATM	B	99,5	99,3	100	100	100	99,7	99,0	99,5
CAZ	B	99,5	99,3	100	100	100	99,7	99,0	99,5

Ampicilina (AMP), Cefalotina (CFL), Gentamicina (GEN), Tobramicina (TOB), Norfloxacin (NOR) Ácido Nalidixico (NAL), Nitrofurantoina (NIT), Sulfametoxazol-Trimetoprima (SXT), Amoxicilina-Ácido Clavulânico (AMC), Ampicilina-Sulbactam (SAB), Piperacilina-Tazobactam (PPT), Cefepima (CPM), Cefoxitina (CFO), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRX), Ciprofloxacina (CIP), Imipenem (IMP), Aztreonam (ATM), Ceftriaxona (CRX), Ciprofloxacina (CIP), Imipenem (IMP), Aztreonam (ATM)

que um outro agente deve ser considerado para uso empírico, e as taxas de resistência superiores a 20% exibidas pelos antimicrobianos ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cefalotina mostram que a utilização desses antimicrobianos deve ter como referência o resultado do antibiograma.

O estudo da suscetibilidade e resistência de ECUP frente aos antimicrobianos do grupo A mostrou que, em 91,3% das cepas, a resistência observada foi no máximo para três antimicrobianos entre os oito testados. Dessa forma, em muitos laudos, os resultados observados com os antimicrobianos do grupo B poderiam não ser relatados para incentivar o uso dos do grupo A. Todavia, nos laboratórios de análises clínicas não hospitalares, todos os antimicrobianos testados geralmente são relatados para permitir uma melhor opção terapêutica e evitar que o paciente retorne ao laboratório. Nos laboratórios hospitalares, os resultados não relatados podem ser prontamente fornecidos ao médico pela Comissão de Controle da Infecção Hospitalar (CCIH), quando necessário.

Na comparação dos testes de suscetibilidade entre os diferentes tipos de ECUP, observaram-se pequenas diferenças entre os grupos estudados. A menor taxa de

suscetibilidade foi mostrada pela ECUP lactose negativa, com destaque para menor suscetibilidade frente a norfloxacin e cefalotina, entretanto esse grupo apresentou maior suscetibilidade frente a sulfametaxazol-trimetoprima. A maior taxa foi exibida pela ECUP beta-hemolítica, com destaque para uma maior suscetibilidade frente a cefalotina, norfloxacin e ácido nalidixico (Tabela 2).

Taxas de resistência de ECUP para as fluoroquinolonas foram relatadas variando de 3% a 22%,^(11,18,21,23) e taxa de resistência de 24% foi observada em pacientes com idade ≥ 60 anos.⁽²²⁾ No presente estudo observou-se uma maior resistência das cepas de ECUP lactose negativa frente às fluoroquinolonas. A taxa de resistência geral de ECUP frente às fluoroquinolonas foi de 7%, já para as ECUP lactose negativa essa taxa foi praticamente o dobro (ciprofloxacina 13,8% e norfloxacin 13,6%).

A presença de ESBL foi confirmada em duas cepas (0,5%). O baixo número de cepas de ECUP produtoras de ESBL mostram que esse mecanismo de resistência não constitui um problema significativo. Para os isolados com teste confirmatório positivo para ESBL, o resultado do antibiograma é reportado como resistente para as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Os carbapenens

não são afetados e são liberados de acordo com o resultado do antibiograma.⁽¹³⁾

Os antimicrobianos testados no grupo B apresentaram taxas de suscetibilidade superiores a 80% (Tabela 2). Taxas de suscetibilidade >97% foram exibidas pelos antimicrobianos imipenem, ceftazidima, cefoxitina, ceftriaxona, cefotaxima, ampicacina, aztreonam e piperacilina-tazobactam. Esses antimicrobianos são considerados mais potentes e apresentaram melhores taxas de suscetibilidade quando comparados com os do grupo A, entretanto o seu uso deve ser reservado para os casos de resistência no grupo A ou nos casos mais graves, como nas infecções urinárias complicadas.

CONCLUSÃO

Apesar de ser uma única espécie, quando classificada por testes bioquímicos, *Escherichia coli* uropatogênica mostrou grande diversidade em relação aos aspectos microbiológicos. Pequenas variações no perfil de suscetibilidade foram observadas entre sete grupos estudados e cepas lactose negativa apresentaram menor suscetibilidade. Entre os antimicrobianos considerados de primeira escolha para o tratamento das infecções urinárias, as taxas de suscetibilidade superiores a 90% observadas para os antimicrobianos nitrofurantoína, norfloxacin e gentamicina indicam que podem ser utilizados empiricamente. A urgência na ITU faz com que, geralmente, essas infecções sejam tratadas empiricamente, sem o resultado da cultura e do antibiograma, e um acompanhamento contínuo dos padrões de suscetibilidade frente aos antimicrobianos é fundamental para uma prescrição terapêutica mais segura e adequada.

Abstract

The microbiological traits and susceptibility of 446 uropathogenic Escherichia coli strains of community origin were studied and diagnosed in Ponta Grossa, Paraná. Based on their microbiological traits, seven groups of uropathogenic Escherichia coli were determined: lactose-positive, lactose-negative, alpha-hemolytic, beta-hemolytic, and three biotype codes with frequencies higher than 10%. Twenty-nine biotype codes were identified; three lactose-positive ones were prominent, representing about 63.5% of the isolates. It was observed that 27% of the strains did not show resistance and were sensitive to the 19 antimicrobials tested, while 8.9% were resistant to more than three antimicrobials among the first-choice ones. Non-lactose fermenting uropathogenic Escherichia coli strains were 13.2%; these strains had lower general susceptibility, where resistance rate to fluoroquinolones was twice as high (about 14%) when compared with the general resistance rate of 7%. Resistance rates <10% were observed for nitrofurantoin, gentamicin, and norfloxacin, indicating that these can be used empirically, while resistance rates >20% were obtained for ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and cephalotin, indicating that their use should be referenced by the antibiogram result.

Keywords

Urinary tract infection; Uropathogenic *Escherichia coli*; Antibiogram

REFERÊNCIAS

1. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J*. 2005 Feb;81(952):83-6.
2. Winn JW, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenber, P, Woods G. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 3rd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1565 p.
3. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4a ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.
4. Foxman B, Riley L. *Molecular epidemiology: Focus on infection*. *Am J Epidemiol*. 2001 Jun 15;153(12):1135-41.
5. Oliveira BG, Albini CA, Botão GMD, Souza HHM. A identificação direta pelos meios cromogênicos é confiável a ponto de dispensar as provas bioquímicas? *NewsLab*. 2006;75:130-42.
6. Poletto KQ, Reis C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, GO. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(5):416-20.
7. Kazmirczk A, Giovelli FH, Goulart LS. Caracterização das infecções do trato urinário diagnosticadas no município de Guarani das Missões - RS. *Rev bras anal clin*. 2005;37(4):205-7.
8. Oplustil CA, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto S.I. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2a ed. São Paulo: Sarvier; 2004, 340p.
9. Trapp EH, Hasenack BS. Bacteriúria assintomática: principais aspectos. *Rev bras anal clin*. 2001;33:159-64.
10. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med*. 1982 Aug 19;307(8):463-8.
11. Camargo CBS, Pedro CC, Lourenço DS, Gironi HAR, Martinez R. Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto - SP: Etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2002;35(2):173-8.
12. *Newprov. Manual de identificação de enterobactérias*. Curitiba, 2006.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17 Informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007.
14. Heilberg IP, Schor N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - ITU. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(1):109-16.
15. Esparis CM, Teixeira LM, Irino K, Gil PF, Almeida MMTB, Lopes GS. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(6):573-6.
16. Benite AMC, Machado SP. Sideróforos: "Uma resposta dos microrganismos". *Quim Nova*. 2002;25(6):1155-64.
17. Pires MC, Frota KS, Martins Junior PO, Correa AF, Cortez-Escalante JJ, Silveira CA. Prevalência e suscetibilidade bacteriana das infecções do trato urinário comunitárias em um Hospital Universitário de Brasília, 2001 a 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(6):643-7.
18. Durate G, Marcolin AC, Gonçalves CV, Quintana SM, Berezowski AT. Infecção urinária na gravidez: análise dos métodos para diagnóstico e do tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002;247(7):471-7.
19. Durate G, Marcolin AC, Quintana SM, Cavalli RC. Infecção urinária na gravidez: revisão. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(2):93-100.
20. Gadelha PS, Costa AG, Rodrigues LCC, Pinheiro GCL, Pinheiro VEG. Infecção do trato urinário na gravidez: aspectos diagnósticos, terapêuticos e prognósticos. *Femina*. 2008;36(12):757-63.
21. Dias Neto JA, Martins ACP, Silva LDM, Tiraboschi RB, Domingos ALA, Colegna AJ, et al. Infecção urinária comunitária: etiologia e sensibilidade bacteriana. *Acta Cir Bras*. 2003;18(5):33-6.

22. Kiffer CR, Mendes C, Oplustil CP, Sampaio JL. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from a major urban city. *Int Braz J Urol.* 2007 Jan-Feb;33(1):42-8.
23. Moreira ED Jr, De Siqueira IC, Alcantara AP, Guereiro De Moura CG, De Carvalho WA, Riley L. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains causing community-acquired urinary tract infections among insured and uninsured populations in a large urban center. *J Chemother.* 2006 Jun;18(3):255-60.
24. Kahan NR, Chinitz DP, Waitman DA, Dushnitzky D, Kahan E, Shapiro M. Empiric treatment of uncomplicated urinary tract infection with fluoroquinolones in older women in Israel: another lost treatment option? *Ann Pharmacother.* 2006 Dec;40(12):2223-7.
25. Warren JW. The infectious practice guidelines for the treatment of uncomplicated cystitis. *Curr Urol Rep.* 2001 Aug;2(4):326-9.
26. Gupta K, Stamm WE. Outcomes associated with trimethoprim/sulphamethoxazole (TMP/SMX) therapy in TMP/SMX resistant community-acquired UTI. *Int J Antimicrob Agents.* 2002 Jun;19(6):554-6.

Correspondência

Luis Antônio Esmerino

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Av. Carlos Cavalcante, 4748 - Bloco M sala 92 – Uvaranas

84030-900 – Ponta Grossa, PR

Telefone: 42-3220-3113

esmerino@uepg.br

Avaliação microbiológica de hemocomponentes

Microbiological evaluation of blood products

Arthur Silva Cipriano¹

Fabio Baltazar do Nascimento²

Giovanni de Castro Borges³

Resumo

O fornecimento de hemocomponentes seguros para serem transfundidos é a grande preocupação dos bancos de sangue nos dias atuais. O surgimento de novas tecnologias como ELISA de 4ª geração e NAT possibilitaram o aumento significativo da sensibilidade e especificidade dos testes empregados no *screening* dos doadores, garantindo hemocomponentes seguros, embora nenhuma transfusão seja isenta de risco, pois ainda existe a possibilidade de janela imunológica. Assim, outro problema tem surgido: o risco de infecções bacterianas por hemocomponentes contaminados. Esta é uma das principais causas, hoje, de morbimortalidade relacionada a transfusão. Foi realizado estudo retrospectivo na Fundação Hemominas - Gerência Controle de Qualidade nos períodos de janeiro de 2002 a junho de 2009. A contaminação microbiológica é investigada por meio de cultura para detecção de fungos e bactérias. Neste período foram testados 15.978 concentrados de hemácias (CH), e 14.096 concentrados de plaquetas randômicos (CP). A inoculação das amostras foi realizada em capela de fluxo laminar. Foram utilizados frascos de hemocultura pediátricos (sistema BacT/Alert - Biomérieux). Os índices de positividade encontrados na primeira amostra destes hemocomponentes foram: 0,25% nos CHM (n=17); e 0,15% nos CP (n=15). É papel dos bancos de sangue investir em metodologias cada vez mais eficazes para reduzir a possibilidade de transfusão de produtos sanguíneos contaminados.

Palavras-chave

Contaminação bacteriana; Reação transfusional; Concentrado de hemácias; Concentrado de plaquetas randômico

INTRODUÇÃO

O fornecimento de hemocomponentes seguros para serem transfundidos é a grande preocupação dos bancos de sangue nos dias atuais.

O sangue pode ser carreador de doenças causadas por uma variedade de agentes infecciosos como protozoários (*T. cruzi*, *Plasmodium* sp., *Babesia* spp., *Leishmania*), bactérias (*Treponema pallidum*, enterobactérias), vírus (HIV, HCV, HBV, HTLV, CMV, EBV), e também príons em modelos animais (Creutzfeldt-Jacob disease).⁽¹⁻³⁾

O grande progresso técnico na área de diagnósticos laboratoriais, contudo, assegurou uma boa qualidade transfusional dos hemocomponentes. No Brasil, a RDC 153/2004 da Anvisa regula a captação, coleta, fracionamento, transfusão e qualidade do sangue doado. Segundo a RDC 153, todo doador de sangue ou aférese deve ser testado sorologicamente para Doença de Chagas, Sífilis, AIDS, Hepatite B, Hepatite C e HTLV I/II, e, em áreas endêmicas,

testar também para malária. A resolução preconiza que todo hemocomponente deve ser estéril de microrganismos, por isso a necessidade de que os captadores de doadores sempre prezem por doadores saudáveis e sem comportamento de risco.⁽⁴⁾

Nas últimas três décadas, o risco de ser infectado através de uma unidade de sangue transfundido caiu de forma contundente.⁽²⁾ Em 1983, o risco de ser contaminado pelo HIV através de transfusão de hemocomponentes nos EUA era de 1:100 transfusões, em 2001 o risco estimado era de 1:1.900.000. No caso da hepatite C, o risco, hoje, é de 1:1.600.000 transfusões nos EUA.^(1,5,6)

O surgimento de novas tecnologias como ELISA de 4ª geração e NAT possibilitaram o aumento significativo da sensibilidade e especificidade dos testes empregados no *screening* dos doadores, garantindo hemocomponentes seguros, embora nenhuma transfusão seja isenta de risco, pois ainda existe a possibilidade de janela imunológica.

¹Biomédico, Núcleo Regional de Patos de Minas – Fundação Hemominas – Patos de Minas, MG, Brasil.

²Médico Coordenador, Núcleo Regional de Patos de Minas – Fundação Hemominas – Patos de Minas, MG, Brasil.

³Bioquímico, Núcleo Regional de Patos de Minas – Fundação Hemominas – Patos de Minas, MG, Brasil.

Assim, outro problema tem surgido, o risco de infecções bacterianas por hemocomponentes contaminados. Esta é uma das principais causas, hoje, de morbimortalidade relacionada a transfusões.⁽⁵⁾

O hemocomponente mais comumente envolvido com contaminação bacteriana é o concentrado de plaquetas (CP), pois é armazenado em temperatura de 20°-24°C, facilitando assim o crescimento bacteriano.⁽⁷⁾ O concentrado de hemácias (CHM) também está relacionado com contaminação bacteriana, contudo tem a seu favor a temperatura de armazenamento entre 2°-6°C. Estima-se hoje que 1: 38.500 transfusões de CHM e 1: 5.000 transfusões de CP causem reação transfusional devido à contaminação bacteriana.^(5,8,9)

A infusão de hemocomponente contaminado pode levar a quadros clínicos graves e óbito, por isso a necessidade de treinamento e reciclagem periódicos de todos os profissionais envolvidos no ato transfusional para que sejam capazes de identificar e tratar esse tipo de reação transfusional. Os sinais e sintomas clínicos da transfusão de sangue contaminado em geral são de rápida instalação: elevação da temperatura basal pré-transfusional, calafrios, tremores, hipotensão, náusea, vômito, diarreia, oligúria, CIVD e choque.^(9,10)

As bactérias mais comumente relacionadas a CP contaminados são da microbiota cutânea normal, como os Gram positivos *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Bacillus cereus* e *Streptococcus* spp. Alguns microrganismos Gram negativos também foram isolados em CP infectados, principalmente enterobactérias (*Enterobacter* spp., *Escherichia coli*).^(6,9)

Entre 1987 e 1991, o FDA contabilizou oito mortes relacionadas à transfusão de CHM contaminados por bactérias, em sete destes isolou-se a *Yersinia* enterocolítica. A *Yersinia* sp. tem crescimento ótimo a 4°C, necessitando de citrato de ferro para se desenvolver. Assim, o CHM é um ótimo meio de cultura para esta bactéria, pois ela é capaz de resistir à lise intracelular pós-fagocitose, e, desta forma, após três semanas de armazenamento, os leucócitos começam a se degradar liberando bactérias viáveis que podem colonizar a papa de hemácias.^(3,11)

MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a RDC 153/04 deve ser realizado controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas em, pelo menos, 1% da produção, ou 10 unidade por mês (o que for maior), sendo realizado mensalmente.

Foi realizado estudo retrospectivo na Fundação Hemominas - Gerência Controle de Qualidade nos períodos de janeiro de 2002 a junho de 2009. Na Fundação Hemominas, a contaminação microbiológica é investi-

gada por meio de cultura para detecção de fungos e bactérias.

Neste período foram testados 15.978 concentrados de hemácias (CHM) e 14.096 concentrados de plaquetas randômicos (CP). A inoculação das amostras foi realizada em capela de fluxo laminar. Foram utilizados frascos de hemocultura pediátricos (sistema BacT/Alert - Biomérieux) e o período de incubação foi de cinco dias. Todo teste de esterilidade detectado como positivo pelo BacT/Alert foi encaminhado ao laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas/Universidade Federal Minas Gerais para confirmação e identificação do microrganismo. Nova amostra da mesma bolsa foi inoculada para confirmação da positividade. Os hemocomponentes produzidos a partir da mesma doação foram rastreados, e aqueles que ainda estavam disponíveis no estoque foram investigados para esterilidade.

RESULTADOS

Os índices de positividade encontrados na primeira amostra destes hemocomponentes foram: 0,25% nos CHM (n=17); 0,15% nos CP (n=15) (Figura 1). O gênero *Staphylococcus* foi o mais frequentemente isolado nas hemoculturas de CP (60%). Nas culturas de CH, os gêneros mais frequentes foram *Staphylococcus* (29,4%) e *Bacillus* (29,4%) (Figura 2). Os microrganismos isolados das culturas de CHM pertenciam a nove gêneros diferentes, enquanto que os das culturas de CP pertenciam a cinco gêneros diferentes (Figura 3). Os gêneros mais frequentemente isolados, *Staphylococcus* e *Bacillus*, são comumente encontrados no ambiente e fazem parte da microbiota epitelial humana. O gênero *Yersinia* sp. foi isolado em um concentrado de hemácias, confirmado na reinoculação e também isolado do concentrado de plaquetas do mesmo doador.

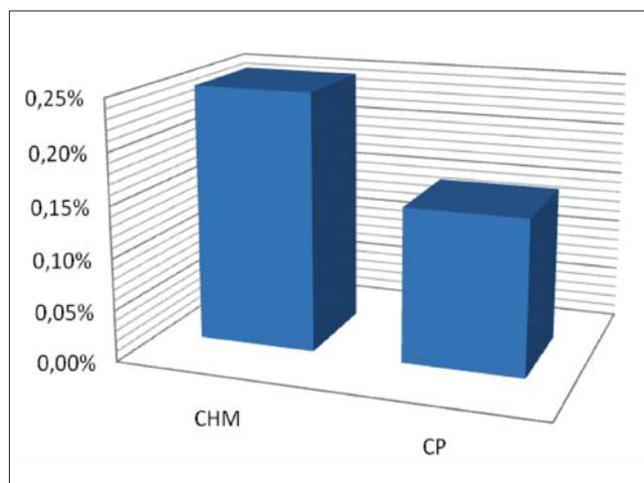


Figura 1. Índices de positividade encontrados nos hemocomponentes.

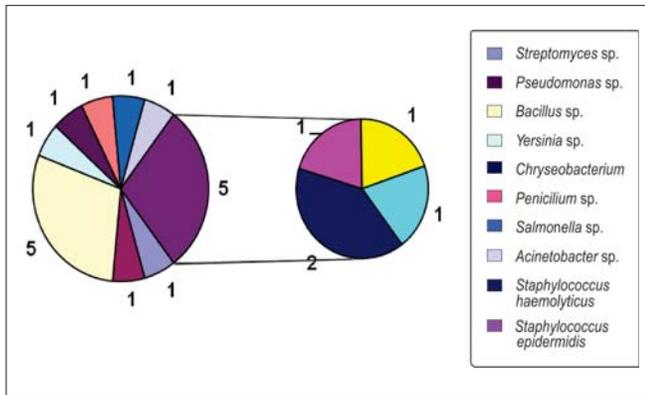


Figura 2. Microrganismos isolados nos CHM.

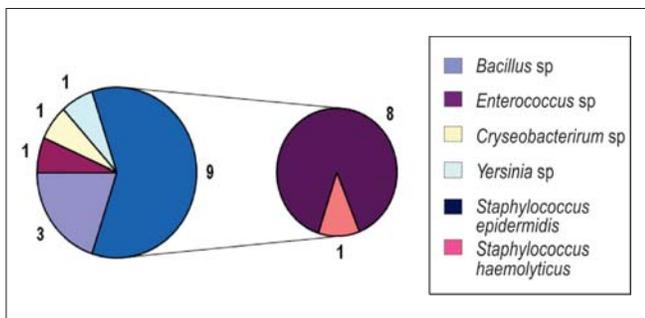


Figura 3. Microrganismos isolados em CP.

DISCUSSÃO

A implantação de controle de qualidade microbiológico na produção de hemocomponentes tem papel fundamental para garantir a segurança transfusional do receptor de sangue, visto que este, na maioria das vezes, já está muito debilitado por sua patologia de base.

Em nosso estudo, a prevalência de bolsas contaminadas foi praticamente idêntica – de 106:100.000 unidades de CHM e CP. Vários estudos prospectivos têm apresentado valores de prevalência para CHM de 0 a 14:100.000 unidades; assim, a prevalência encontrada em nosso trabalho foi maior. Para os CP, os estudos têm demonstrado um valor de 8 a 80:100.000 unidades contaminadas; assim, para CP, a prevalência encontrada está maior, de acordo com a literatura.^(1,12) Outro trabalho tem encontrado dados semelhantes aos apresentados neste artigo, com índice de positividade em CP entre 0,02% e 1,2%, enquanto que para CHM os valores variam de 0,1 a 0,2%.⁽¹³⁾

Os gêneros encontrados mais frequentemente foram *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Bacillus* sp. Isso tem correspondência em alguns estudos que apontam para uma prevalência maior de agentes Gram positivos implicados com hemocomponentes contaminados, pois estes fazem

parte da microbiota normal da pele.⁽⁶⁾ Contudo, o número de reações transfusionais por contaminação bacteriana de hemocomponentes é baixo. Alguns aspectos precisam ser considerados para esse número baixo de reações, como a subnotificação por desconhecimento dos sinais e sintomas característicos deste tipo de reação ou confusão com a própria doença de base do paciente transfundido, a quantidade de bactérias contaminantes, o tipo de bactéria e sua patogenicidade e o estado clínico do paciente, como imunossupressão, idade e desnutrição.^(1,7,14)

É importante salientar que existem diversas possibilidades para minimizar a contaminação bacteriana de hemocomponentes. Primeira estratégia seria uma triagem mais detalhada do doador de sangue, avaliando mais precisamente as situações que poderiam causar uma bacteremia transitória no doador, como procedimentos dentários e infecções gastrointestinais nos últimos trinta dias.^(6,9) Outro ponto a ser considerado é a antisepsia adequada do local da venopunção. O uso de antissépticos apropriados como álcool 70% combinado com uma fricção vigorosa reduz quantitativamente a microbiota normal da pele no sítio da punção.⁽¹⁰⁾ Contudo, a presença de bactérias nas camadas mais profundas da pele não são eliminadas simplesmente com a limpeza da pele; assim, o desvio dos primeiros mililitros de sangue coletado diminuem a possibilidade de contaminação das bolsas de sangue total.⁽⁹⁾ Foi demonstrado que o desvio de 10-30 mL do primeiro jato do sangue coletado reduz entre 40% a 90% a contaminação do hemocomponente, dependendo do volume desviado e do hemocomponente produzido.⁽¹²⁾ Hoje há bolsas satélites para desvio do primeiro jato, que é aproveitado para a realização de testes sorológicos e imunohematológicos.

A otimização dos processos de produção, fracionamento e estocagem também podem auxiliar a reduzir a contaminação bacteriana, por isso existe limite de tempo para se estocar cada hemocomponente; outro aspecto seria a deleucorredução universal.⁽¹⁾

Atualmente procuram-se métodos eficazes para a detecção pré-transfusional de bactérias nos hemocomponentes. A análise macroscópica da bolsa pode revelar alterações de cor que podem indicar contaminação bacteriana, contudo esse é um método com baixa sensibilidade e especificidade, por isso outras formas de detecção já estão sendo usadas, como cultura direta para bactérias e fungos.

Nos países desenvolvidos há a possibilidade de mensurar o consumo de O₂ ou a produção de CO₂ pelos microrganismos e ainda métodos indiretos como mensuração quantitativa da glicose. O uso da biologia molecular para pesquisa de ácidos nucleicos (NAT) e ribossomos bacterianos são novas ferramentas para se evitar a contaminação bacteriana.^(1,6,9,15)

CONCLUSÃO

O controle microbiológico dos hemocomponentes tem ganhado destaque importante, que impacta diretamente na segurança transfusional do receptor. É papel dos bancos de sangue investir em metodologias cada vez mais eficazes para reduzir a possibilidade de transfusão de produtos sanguíneos contaminados.

Abstract

The supply of safe blood products transfused is safe to be a major concern for blood banks today. The emergence of new technologies such as 4th generation ELISA and NAT enabled to significantly increase the sensitivity and specificity of the tests used in donor screening, ensuring safe blood transfusions, although no transfusion is risk free because there is still the possibility of window period. So another problem has arisen, the risk of bacterial infection by contaminated blood products. This is a major cause of morbidity and mortality related to transfusion now. A retrospective study in Hemominas Foundation - Management Quality Control was performed during the periods from January 2002 to June 2009. Microbiological contamination is investigated by culture for detection of fungi and bacteria. In this period, 15,978 were tested red blood cell (RBC), 14,096 random platelet concentrates (WB -plt). Inoculation of samples was performed in a laminar flow hood. We used pediatric blood culture bottles (Bact/Alert - Biomérieux). The positivity rates found in the first sample of blood products were 0.25% in RBC (n = 17), 0.15% in WB-plt (n = 15). The role of blood banks to invest in ever more effective methods to reduce the possibility of transfusion of contaminated blood products.

Keywords

Blood products; Bacterial contamination; Transfusion reaction; Red blood cells concentrate; Random platelet concentrates

REFERÊNCIAS

1. Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, Vostal JG, Epstein JS, Goodman JL. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;575-89.
2. Snyder EL, Dodd RY. Reducing the risk of blood transfusion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;433-42.
3. Klein HG, Anstee DJ. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11a ed. Massachusetts, Ed. Blackwell, 2005, 744p.
4. Seitz R, Heiden M. Quality and safety in blood supply in 2010. *Transfus. Med Hemother*. 2010 Jun;37(3):112-117.
5. Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. Transfusion-transmitted infections. *J Transl Med*. 2007 Jun 6;5:25.
6. Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jan;18(1):195-204.
7. Blajchman MA, Goldman M. Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance and prevention. *Semin Hematol*. 2001 Oct;38(4 Suppl 11):20-6.
8. Kaufman RM. Platelets: testing, dosing and the storage lesion-recent advances. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:492-6.
9. Covas DT, Langhi JDM, Bordim JO. *Hemoterapia-fundamentos e prática*. 1 ed. São Paulo, Ed. Atheneu, 2007, 513p.
10. Santos MQ, Zamadei RAN, Benedetti VP, Onofre SB. Avaliação do processo anti-séptico em sítio de punção venosa de doadores de sangue. *Rev. Bras. Anál. Clin*. 2008;40(4):293-5.
11. Hoelen DW, Tjan DH, Schouten MA, Dujardin BC, van Zanten AR. - Severe *Yersinia enterocolitica* sepsis after blood transfusion. *Neth J Med*. 2007 Sep;65(8):301-3.
12. Liumbruno GM, Catalano L, Piccinini V, Pupella S, Grazzini G. Reduction of risk of bacterial contamination of blood components through diversion of the first part of the donation of blood and blood components. *Blood Transfus*. 2009 Apr;7(2):86-93.
13. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reaction by blood components. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(7):919-25.
14. Blajchman MA. Reducing the risk of bacterial contamination of cellular blood components. *Dev Biol (Basel)*. 2000;102:183-93.
15. McKane AV, Ward N, Senn C, Eubanks J, Wessels L, Bowman R. Analysis of bacterial detection in whole blood-derived platelets by quantitative glucose testing at a university medical center. *Am J Clin Pathol*. 2009 Apr;131(4):542-51.

Correspondência

Arthur Silva Cipriano

Rua Diacuí, 383 - apto 104 – Caiçaras

38702-176 – Patos de Minas, MG

E-mail: arthur.cipriano@hemominas.mg.gov.br

Contaminação de superfícies inanimadas de UTI por bactérias Gram negativas multirresistentes em hospital universitário de Goiânia, GO

Contamination of ICU inanimate surfaces by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in university hospital of Goiânia, GO

Alessandra Marques Cardoso¹

Cleomenes Reis²

Resumo

As superfícies inanimadas dos hospitais podem servir como reservatório de bactérias patogênicas. Dessa forma, objetivou-se isolar e identificar bastonetes Gram negativos de bandejas, camas e equipos de soro de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), estabelecer a frequência, o percentual e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados. Swabs umedecidos em solução salina a 0,85% esterilizada foram friccionados sobre superfícies inanimadas, inoculados em caldo BHI e semeados em agar MacConkey. As colônias foram submetidas à identificação bioquímica e ao antibiograma pelo método de difusão em disco, sendo avaliados: gentamicina, amicacina, ceftazidima, amoxicilina-ácido clavulânico, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina e imipenem. Dentre as 275 amostras de bandejas, em 119 (43,3%) foram isolados bastonetes Gram negativos (BGN), sendo 111 identificados: 49 (44,1%) enterobactérias e 62 (55,9%) não fermentadores da glicose. Das 275 amostras de camas, 125 (45,5%) apresentaram crescimento de BGN, sendo 118 identificados: 47 (39,8%) enterobactérias e 71 (60,2%) não fermentadores. Das 49 amostras de equipos de soro, 11 (22,4%) apresentaram BGN: quatro (36,4%) enterobactérias e sete (63,6%) não fermentadores. A maioria dos isolados apresentou resistência antimicrobiana e o imipenem obteve melhor atividade *in vitro*. Com a emergência da resistência dos BGN, procedimentos de limpeza são importantes na redução dos índices de infecção hospitalar em UTI.

Palavras-chave

Bactérias Gram negativas; Superfícies inanimadas; Unidades de Terapia Intensiva; Resistência aos antimicrobianos

INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares, atualmente designadas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), representam um agravo de grande significado epidemiológico, tanto no contexto de saúde pública como no da assistência hospitalar, sendo responsáveis pela elevação das taxas de morbimortalidade, ampliação do tempo de permanência dos pacientes no hospital e, conseqüentemente, aumento dos custos do tratamento, levando a conseqüências indesejáveis, seja do ponto de vista humano, econômico ou social.⁽¹⁾

No ambiente hospitalar merecem destaque as Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde se encontram os pacientes mais graves, que necessitam de monitoramento e suporte contínuos das funções vitais. Os pacientes de UTI apresentam doenças ou condições clínicas predisponentes a infecções. Muitos já se encontram colonizados ao serem admitidos na unidade, e a maioria é submetida a procedimentos invasivos e/ou imunossuppressores com finalidade diagnóstica e terapêutica. Além disso, a resposta imunológica do paciente em terapia intensiva frente ao processo infeccioso é normalmente deficiente.⁽²⁾

¹Biomédica. Doutora e Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública, com área de concentração em Microbiologia, pela Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia, GO, Brasil.

Professora Adjunta da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia, GO, Brasil.

Biomédica concursada da Secretaria Estadual de Saúde de Goiás, atuando na Escola Estadual de Saúde Pública "Cândido Santiago" (ESAP/SEST-SUS).

²Odontólogo, Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública pela Universidade Federal de Goiás – UFG. Livre-Docente do DMIPP, IPTSP-UFG – Goiânia, GO, Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia Médica e Ambiental do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – UFG. – Goiânia, GO, Brasil.

Artigo recebido em 19/12/2010

Artigo aprovado em 16/02/2016

Na topografia das IRAS, observa-se que os principais focos são trato urinário, corrente sanguínea, trato respiratório e sítio cirúrgico. As infecções do trato urinário (ITU), por exemplo, especialmente em pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI), tem como principal causa a sondagem vesical de demora (SVD). O tempo em que o paciente permanece com a sonda, falhas na técnica deste cateterismo quanto à assepsia, idade e gênero, são fatores que contribuem para o desenvolvimento de ITU, ocasionando maior tempo de internação e aumento do risco de mortalidade.⁽³⁾

Por estarem debilitados, os pacientes da UTI são particularmente vulneráveis à colonização e infecção por bactérias presentes nas mãos dos profissionais e no próprio ambiente da UTI. A insuficiência das práticas de higienização das mãos e a contaminação do meio ambiente contribuem para o aumento do risco de IRAS.⁽⁴⁾

De acordo com Carvalho et al.,⁽⁵⁾ a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) deve ser responsável pela implementação de um sistema informatizado para o monitoramento e avaliação dos casos de IRAS, possibilitando a divulgação de informações pertinentes e, ainda, discutir com o laboratório de microbiologia sobre a atualização do diagnóstico na detecção de patógenos, bem como na detecção de perfis multirresistentes, padronizando e revisando periodicamente a relação dos antimicrobianos administrados aos pacientes.

Hospitais no mundo todo enfrentam uma situação de crise envolvendo a emergência e a disseminação de bactérias multirresistentes, particularmente aquelas que podem causar infecções em pacientes de UTI, como enterobactérias resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e às fluoroquinolonas.⁽⁶⁾

Segundo Abramczyk et al.,⁽⁷⁾ as bactérias Gram negativas são patógenos comumente identificados em infecções hospitalares (54,8%), seguidas por bactérias Gram positivas (23,8%) e leveduras (21,4%). Entre as Gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são as espécies não fermentadoras da glicose mais isoladas de amostras clínicas de pacientes hospitalizados.⁽¹⁾

Muitas superfícies inanimadas podem servir como fonte de bactérias Gram negativas multirresistentes em uma UTI. A identificação e desinfecção dessas fontes podem contribuir na prevenção e controle de surtos de infecção hospitalar.^(8,9,10)

O meio ambiente do hospital, incluindo as superfícies inanimadas que cercam o paciente, guarda relação com as infecções hospitalares, podendo proporcionar focos de contato e transmissão de microrganismos patogênicos, de modo que não se pode deixar de considerar a parcela de responsabilidade relacionada aos padrões de higiene e

desinfecção no ambiente hospitalar sobre a incidência das infecções hospitalares.⁽¹¹⁾

Nosso estudo objetivou avaliar a contaminação de superfícies inanimadas (bandejas, camas e equipos de soro) em uma Unidade de Terapia Intensiva, isolando, identificando, estabelecendo a frequência e o perfil de suscetibilidade de bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose e enterobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, recebendo parecer favorável, conforme o Protocolo CEPMHA/HC/UFG N° 019/2003.

Foram coletadas 599 amostras de superfícies inanimadas, sendo 275 de bandejas, 275 de camas e 49 de equipos de soro, no período compreendido entre abril de 2003 a abril de 2004, em uma UTI de um Hospital Universitário de Goiânia, GO.

A coleta das amostras de superfícies inanimadas foi realizada acompanhando o período de internação de 181 pacientes na UTI, os quais foram selecionados aleatoriamente. As amostras de superfícies inanimadas foram coletadas no primeiro dia de internação e a cada sete dias até a alta ou óbito dos pacientes.

Para a coleta das amostras, *swabs* esterilizados e umedecidos em solução de NaCl a 0,85% foram friccionados sobre bandejas de aço inoxidável, grades laterais de camas e equipos de soro, utilizados no cuidado aos pacientes. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Médica e Ambiental do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás em recipientes esterilizados com a finalidade de serem processados para pesquisa de bactérias Gram negativas, observando-se os critérios de biossegurança.

Os *swabs* foram inoculados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 36,5°C por até 48 horas. Após o término do período de incubação, 50 microlitros do caldo BHI foram transferidos para o agar MacConkey (MC). As placas de MC, semeadas pela técnica de esgotamento em superfície, foram incubadas a 36,5°C por 24 a 48 horas. As colônias que se desenvolveram foram submetidas a observações macroscópicas, microscópicas pela coloração de Gram e triagem em agar triplice açúcar e ferro (*Triple Sugar Iron - TSI*), o que permitiu a classificação das bactérias Gram negativas isoladas em dois grupos: fermentadoras da glicose (enterobactérias) e não fermentadoras da glicose, sendo posteriormente fenotipadas por provas bioquímicas, segundo Koneman et al.⁽¹²⁾

O perfil de suscetibilidade dos microrganismos isolados foi determinado pelo método de difusão em disco

(Kirby-Bauer), utilizando os discos de papel do laboratório Sensifar/Cefar (São Paulo-Brasil), de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI 2015*,⁽¹³⁾ sendo avaliados: gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), ceftazidima (30 µg), amoxicilina - ácido clavulânico (30 µg), cloranfenicol (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), ciprofloxacina (5 µg) e imipenem (10 µg).

RESULTADOS

Bactérias Gram negativas foram encontradas em 255 (42,6%) das 599 superfícies inanimadas avaliadas, sendo isoladas em 43,3%, 45,5% e 25,9% das amostras de bandejas, camas e equipos de soro, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência total de bastonetes Gram negativos e *Pseudomonas aeruginosa* isolados de bandejas, camas e equipos de soro de uma Unidade de Terapia Intensiva, Goiânia, GO, abril de 2003 a abril de 2004

Superfícies inanimadas	Número total de superfícies inanimadas analisadas	Bastonetes Gram negativos (total)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		N	%	N	%
Bandejas	275	119	43,3	58	21,1
Camas	275	125	45,5	67	24,4
Equipos de soro	49	11	22,4	06	12,2
Total	599	255	42,6	131	21,9

Entre as 599 amostras oriundas de superfícies inanimadas, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* foi observada em 131 delas (21,9%). *P. aeruginosa* foi isolada em 21,1%, 24,4% e 12,2% das amostras obtidas de bandejas, camas e equipos de soro, respectivamente (Tabela 1).

Observou-se que, entre as 275 amostras de bandejas, bactérias Gram negativas foram isoladas em 119 (43,3%) como mostra a Tabela 1, sendo 111 delas identificadas como: 49 (44,1%) enterobactérias e 62 (55,9%) não fermentadoras da glicose.

Das 119 amostras positivas obtidas de bandejas, foram isoladas 122 bactérias Gram negativas. Destas, 111 foram identificadas: 58 (52,3%) *Pseudomonas aeruginosa*, 16 (14,4%) *Enterobacter agglomerans*, 16 (14,4%) *Klebsiella pneumoniae*, 11 (9,9%) *Enterobacter aerogenes*, quatro (3,6%) *Pseudomonas stutzeri*, três (2,7%) *Escherichia coli*, dois (1,8%) *Proteus mirabilis* e um (0,9%) *Enterobacter cloacae* (Figura 1).

Em três amostras de bandejas, foram isolados simultaneamente dois microrganismos (*E. aerogenes* e *K. pneumoniae*; *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*; *E. aerogenes* e *K. pneumoniae*).

As 49 enterobactérias isoladas de bandejas apresentaram o seguinte perfil de resistência: duas (4,1%) ao imipenem, 18 (36,7%) à amicacina, 20 (40,8%) à gentamicina, 20 (40,8%) à ciprofloxacina, 25 (51,0%) à amoxicilina-ácido clavulânico, 28 (57,1%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, 34 (69,4%) ao cloranfenicol e 34 (69,4%) à ceftazidima (Tabela 2).

O perfil de resistência das 62 bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas das bandejas foi: seis (9,7%) ao imipenem, 28 (45,2%) à amoxicilina-

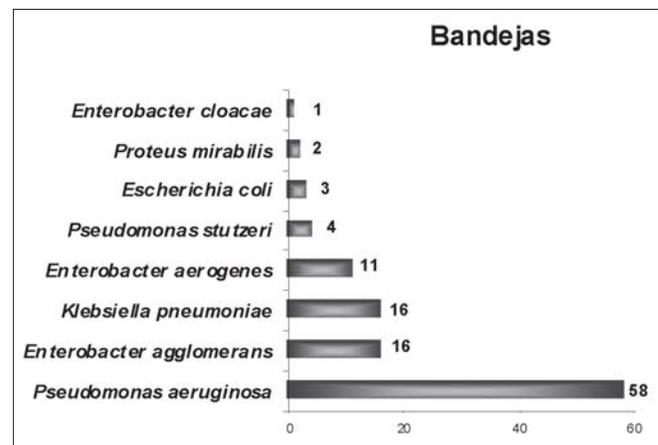


Figura 1. Espécies de bastonetes Gram negativos isoladas de bandejas de uma Unidade de Terapia Intensiva, Goiânia, GO, abril de 2003 a abril de 2004.

ácido clavulânico, 29 (46,8%) à gentamicina, 36 (58,1%) à ciprofloxacina, 40 (64,5%) à amicacina, 41 (66,1%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, 51 (82,2%) ao cloranfenicol e 54 (87,1%) à ceftazidima (Tabela 2).

Em relação às 275 amostras obtidas de camas, a presença de bactérias Gram negativas foi observada em 125 (45,5%) como mostra a Tabela 1, sendo 118 assim identificadas: 47 (39,8%) enterobactérias e 71 (60,2%) não fermentadoras da glicose.

Das 125 amostras positivas obtidas de camas, foram isoladas 127 bactérias Gram negativas. Destas, 118 foram identificadas: 67 (56,9%) *Pseudomonas aeruginosa*, 21 (17,9%) *Enterobacter agglomerans*, 10 (8,6%) *Klebsiella pneumoniae*, nove (7,6%) *Enterobacter aerogenes*, três (2,5%) *Pseudomonas stutzeri*, três (2,5%)

Tabela 2 - Perfil de resistência de bastonetes Gram negativos isolados de bandejas, camas e equipos de soro de uma Unidade de Terapia Intensiva, Goiânia-GO, abril de 2003 a abril de 2004

	Enterobactérias						Não fermentadores da glicose					
	Bandejas		Camas		Equipos de soro		Bandejas		Camas		Equipos de soro	
	Nº de bactérias resistentes	%*	Nº de bactérias resistentes	%*	Nº de bactérias resistentes	%*	Nº de bactérias resistentes	%*	Nº de bactérias resistentes	%*	Nº de bactérias resistentes	%*
Imipenem	2	4,1	2	4,2	0	0,0	6	9,7	05	7,0	1	14,3
Amicacina	18	36,7	29	61,7	1	25,0	40	64,5	46	64,8	6	85,7
Gentamicina	20	40,8	27	57,4	1	25,0	29	46,8	32	45,1	5	71,4
Ciprofloxacina	20	40,8	21	44,7	0	0,0	36	58,1	46	64,8	6	85,7
Amoxicilina-ác. clavulânico	25	51,0	24	51,1	3	75,0	28	45,2	37	52,1	4	57,1
Sulfametoxazol-trimetoprim	28	57,1	27	57,4	0	0,0	41	66,1	45	63,4	6	85,7
Cloranfenicol	34	69,4	31	65,9	0	0,0	51	82,2	59	83,1	7	100,0
Ceftazidima	34	69,4	39	82,9	2	50,0	54	87,1	58	81,7	7	100,0

*Percentual calculado em relação ao total de bastonetes Gram negativos identificados: enterobactérias em bandejas (49), camas (47) e equipos de soro (4); nãofermentadores da glicose em bandejas (62), camas (71) e equipos de soro (7).

Hafnia alvei, um (0,8%) *Proteus mirabilis*, um (0,8%) *Enterobacter cloacae*, uma (0,8%) *Klebsiella oxytoca*, um (0,8%) *Citrobacter freundii* e uma (0,8%) *Stenotrophomonas maltophilia* (Figura 2).

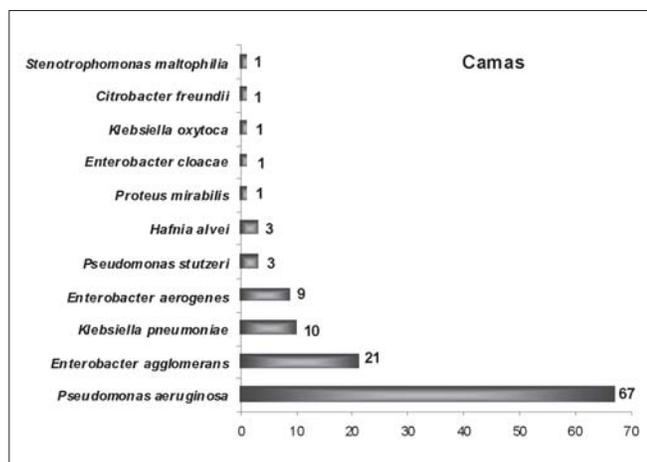


Figura 2. Espécies de bastonetes Gram negativos isoladas de camas de uma Unidade de Terapia Intensiva, Goiânia, GO, abril de 2003 a abril de 2004.

Em duas amostras de camas foram isolados simultaneamente dois microrganismos (*P. aeruginosa* e *C. freundii*; *P. mirabilis* e *E. agglomerans*).

As 47 enterobactérias isoladas de camas apresentaram o seguinte perfil de resistência: duas (4,2%) ao imipenem, 21 (44,7%) à ciprofloxacina, 24 (51,1%) à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, 27 (57,4%) à gentamicina, 27 (57,4%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, 29 (61,7%) à amicacina, 31 (65,9%) ao cloranfenicol e 39 (82,9%) à ceftazidima (Tabela 2).

O perfil de resistência das 71 bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas de cama foi: cinco (7,0%) ao imipenem, 32 (45,1%) à gentamicina, 37 (52,1%) à amoxicilina-ácido clavulânico, 45 (63,4%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, 46 (64,8%) à amicacina, 46 (64,8%) à ciprofloxacina, 58 (81,7%) à ceftazidima e 59 (83,1%) ao cloranfenicol (Tabela 2).

Em relação às 49 amostras obtidas de equipos de soro, houve crescimento de bactérias Gram negativas em 11 (22,4%), como mostra a Tabela 1, sendo quatro (36,4%) enterobactérias e sete (63,6%) não-fermentadoras da glicose.

Foram identificadas 11 bactérias Gram negativas de amostras oriundas de equipos de soro, sendo seis (54,5%) *Pseudomonas aeruginosa*, três (27,3%) *Enterobacter aerogenes*, uma (9,1%) *Escherichia coli* e uma (9,1%) *Pseudomonas sp.* (Figura 3).

As quatro enterobactérias isoladas de equipos de soro apresentaram o seguinte perfil de resistência: três

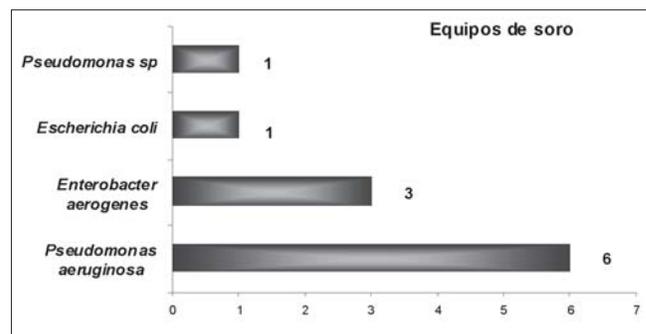


Figura 3. Espécies de bastonetes Gram negativos isoladas de equipos de soro de uma Unidade de Terapia Intensiva, Goiânia, GO, abril de 2003 a abril de 2004.

(75,0%) à amoxicilina-ácido clavulânico, duas (50,0%) à ceftazidima, uma (25,0%) à gentamicina e uma (25,0%) à amicacina. Nenhuma resistência foi observada frente ao imipenem, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol e ciprofloxacina (Tabela 2).

O perfil de resistência das sete bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas de equipos de soro foi: um (14,3%) ao imipenem, quatro (57,1%) à amoxicilina-ácido clavulânico, cinco (71,4%) à gentamicina, seis (85,7%) ao sulfametoxazol-trimetoprim, seis (85,7%) à amicacina, seis (85,7%) à ciprofloxacina, sete (100,0%) à ceftazidima e sete (100,0%) ao cloranfenicol (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O isolamento de bactérias Gram negativas em bandejas (43,3%), camas (45,5%) e equipos de soro (25,9%) da UTI em estudo evidenciou a elevada contaminação das superfícies inanimadas por microrganismos patogênicos. Esses resultados ressaltam a importância dos reservatórios de bactérias Gram negativas no ambiente hospitalar, sobretudo em UTI, considerando que esses patógenos são comumente identificados em casos de IRAS, segundo Abramczyk et al.⁽⁷⁾

Sales et al.,⁽¹⁰⁾ ao realizarem uma análise microbiológica de superfícies inanimadas (equipamentos/materiais e mobiliários de maior contato com os pacientes e profissionais) de uma UTI, chegaram à conclusão que a participação da equipe multidisciplinar é preponderante na prevenção do surgimento e transmissão de patógenos multirresistentes, de modo que somente a educação continuada aliada à promoção de práticas seguras no cuidado ao paciente crítico, em conjunto com um ambiente microbiologicamente seguro, podem assegurar a excelência da assistência.⁽²⁰⁾

Os bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose foram mais frequentes que as enterobactérias, tanto nas amostras de bandeja (55,9%) quanto nas de cama (60,2%) e equipos de soro (63,6%), com destaque para *Pseudomonas aeruginosa*, considerado um patógeno oportunista de exigência nutricional mínima, com grande tolerância às variações ambientais e resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos, habilidades que garantem sua sobrevivência no ambiente hospitalar. *P. aeruginosa* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas, sendo causa comum de infecção urinária, pneumonia, infecção de sítio cirúrgico e sepse,^(12,14) e, ainda, de acordo com Lucchetti-Miganeh et al.,⁽¹⁵⁾ este patógeno tornou-se uma das principais causas de infecção hospitalar em todo o mundo, sendo considerado uma séria ameaça à saúde pública em função do uso excessivo e inadequado de antibióticos, situação que proporciona a seleção de cepas

multirresistentes contra as quais existem restritas opções de tratamento.⁽¹⁴⁾

A emergência dos bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose, como importantes patógenos hospitalares, salienta a necessidade de estudos sobre a contaminação das superfícies inanimadas situadas em unidades hospitalares onde os pacientes recebem cuidados intensivos prolongados.

Após a pesquisa de bactérias Gram negativas em respiradores mecânicos, bombas de infusão, monitores cardíacos, estetoscópios, grades da cama, maçaneta interna da porta de entrada e saída, gaveta de cabeceira do leito, mesa de evolução clínica e telefone, detectou-se positividade para *Acinetobacter baumannii* multirresistente em 12 de 49 amostras, correspondendo a 24,4% do total de amostras analisadas.⁽¹⁰⁾ Em nosso estudo, esse patógeno não foi isolado, embora a literatura reforce seu papel nas IRAS, assim como o papel de outros Gram negativos. Assim, corroborando com as conclusões do estudo de Sales et al.,⁽¹⁰⁾ conhecer a contaminação das superfícies inanimadas e a forma de eliminá-la promovem qualidade da assistência e segurança ao paciente.⁽²⁰⁾

Entre as enterobactérias isoladas, destacaram-se *Enterobacter* e *Klebsiella*, gêneros capsulados que podem ser encontrados em vida livre e envolvidos em infecções hospitalares, sendo quase sempre resistentes a muitos antimicrobianos. As espécies do gênero *Enterobacter*, principalmente *E. cloacae* e *E. agglomerans* são consideradas emergentes e importantes patógenos humanos.^(16,17)

Renner & Carvalho⁽¹⁸⁾ fizeram uma pesquisa descritiva analítica transversal e observacional em uma UTI adulto, durante um mês, em um hospital do Vale do Rio Pardo, cidade de Santa Cruz do Sul, RS, a partir da qual conseguiram demonstrar que, das 45 superfícies analisadas (estetoscópio, respirador, mesa, cama, dispensador de soro/alimento, teclados e prontuário), referentes a dez leitos, o crescimento bacteriano foi observado em 38 (84,4%) superfícies, sendo que, em duas (4,4%) superfícies, foi observado o crescimento de mais de uma espécie bacteriana. Desse modo, recuperaram-se quarenta bactérias, as quais foram identificadas como: 42% *Staphylococcus epidermidis*, 37% *Staphylococcus aureus*, 15% *Bacillus* spp., 3% *Enterococcus* spp. e 3% *Klebsiella pneumoniae*.⁽⁹⁾

Em um estudo realizado por Sousa et al.,⁽²¹⁾ em um hospital escola de Goiânia, GO, foram analisados resultados de exames de hemoculturas no período compreendido entre 2010 a 2013. Os resultados evidenciaram o isolamento de patógenos importantes, sendo mais frequentes entre os Gram positivos: *Staphylococcus* spp. (44,6%) e *Enterococcus* spp. (5,3%), e entre os Gram negativos: *P. aeruginosa* (14,1%), *K. pneumoniae* (8,2%), *Enterobacter* spp. (5,3%) e *A. baumannii* (4,7%). Quando comparado ao pre-

sente estudo, observa-se a presença dos microrganismos Gram negativos nas superfícies inanimadas de UTI, caracterizando um potencial reservatório/fonte de infecção.⁽²¹⁾

Em nosso estudo, grande parte das enterobactérias isoladas apresentou-se resistente aos antimicrobianos avaliados, como aminoglicosídeos (40,8% de resistência à gentamicina entre isolados de bandejas e 57,4% entre os de camas; 36,7% de resistência à amicacina entre isolados de bandejas e 61,7% entre os de camas), aminopenicilinas associadas a um inibidor de beta-lactamases (51,0% de resistência à amoxicilina-ácido clavulânico entre os isolados de bandejas e 51,1 entre os de camas, e 75,0% entre isolados de equipos de soro), cotrimoxazol (57,1% de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim entre os isolados de bandejas e 57,4 entre os de camas) e ciprofloxacina (40,8% de resistência entre isolados de bandejas e 44,7% entre os de camas).

Em um estudo realizado por De Moraes et al.,⁽¹⁾ as bactérias Gram negativas envolvidas em casos de infecção hospitalar apresentaram elevada resistência às cefalosporinas e aos aminoglicosídeos. No presente estudo, observou-se acentuada resistência à ceftazidima, tanto nos isolados de bandejas (69,4% de resistência entre enterobactérias e 87,1% entre não fermentadores da glicose), como nos de camas (82,9% de resistência entre enterobactérias e 81,7% entre não fermentadores da glicose) e nos de equipos de soro (50,0% de resistência entre enterobactérias e 100,0% entre não fermentadores da glicose). Esses resultados ressaltam a preocupação em relação ao uso indiscriminado de alguns antimicrobianos na prática hospitalar, conduta que pode levar ao aumento da resistência bacteriana por pressão seletiva.

Elevada resistência foi observada entre bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose isolados de bandejas (45,2% de resistência à amoxicilina-ácido clavulânico, 46,8% à gentamicina, 58,1% à ciprofloxacina, 64,5% à amicacina, 66,1% ao sulfametoxazol-trimetoprim, 82,2% ao cloranfenicol e 87,1% à ceftazidima), camas (45,1% de resistência à gentamicina, 52,1% à amoxicilina-ácido clavulânico, 63,4% ao sulfametoxazol-trimetoprim, 64,8% à amicacina, 64,8% à ciprofloxacina, 81,7% à ceftazidima e 83,1% ao cloranfenicol) e equipos de soro (57,1% de resistência à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, 71,4% à gentamicina, 85,7% à ciprofloxacina, amicacina e sulfametoxazol-trimetoprim, e 100,0% à ceftazidima e cloranfenicol).

O antimicrobiano considerado mais ativo contra os bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose foi o imipenem, com taxa de resistência de 9,7% entre os isolados de bandeja, 7,0% entre os de cama e 14,3% entre os de equipos de soro. Em um estudo realizado por Yaman et al.,⁽¹⁹⁾ em um hospital universitário da Turquia, evidenciou-se que, entre os isolados clínicos, apenas 12,8% fo-

ram resistentes ao imipenem, que, juntamente com o meropenem, foi considerado o antimicrobiano mais ativo contra bactérias Gram negativas. Contudo, Brink et al.⁽²⁰⁾ ressaltam a importância do uso racional de antimicrobianos como os carbapenêmicos, a fim de que, no futuro próximo, não haja resistência pronunciada a essa droga, impossibilitando seu uso nos casos de infecções graves.

No trabalho realizado por Renner & Carvalho,⁽⁹⁾ para o antibiograma dos bastonetes Gram negativos foram utilizados os antimicrobianos ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, imipenem e gentamicina. Evidenciou-se a presença de *K. pneumoniae* no respirador de um dos leitos, cujo perfil de suscetibilidade revelou resistência a cefalosporinas de terceira geração e ao imipenem. Relatou-se ainda que o paciente deste leito apresentava infecção respiratória por *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de terceira geração e ao imipenem. Os autores enfatizaram a elevada incidência de contaminação ambiental, provavelmente reflexo da baixa adesão à higienização das mãos e medidas questionáveis de higienização ambiental, pois durante o estudo não foi observado nenhum procedimento de limpeza nas superfícies avaliadas, mesmo com a recomendação de que as mesmas sejam desinfetadas com álcool a 70% uma vez ao dia e após alta ou óbito do paciente.⁽¹⁹⁾

Segundo Pittet et al.,⁽²¹⁾ a higienização das mãos é uma medida altamente eficaz na prevenção da transmissão cruzada de microrganismos no ambiente hospitalar e na redução da incidência de infecções associadas aos cuidados prestados pela equipes de saúde, ressaltando a necessidade de educação continuada dos profissionais no que tange às técnicas de lavagem das mãos, além da desinfecção periódica de equipamentos/instrumentos.^(9,21)

Os Centers for Disease Control (CDC) estabelecem, como medida de Prevenção Padrão no Controle das IRAS, que sejam aplicados métodos de limpeza e desinfecção em superfícies inanimadas presentes no ambiente hospitalar, pois determinados microrganismos podem sobreviver por tempo prolongado em superfícies inanimadas e em equipamentos encontrados próximos aos leitos se estes não forem adequadamente limpos e desinfetados,⁽²²⁾ o que foi evidenciado no presente estudo.

CONCLUSÕES

Evidenciou-se elevado percentual de contaminação das superfícies inanimadas da UTI de um Hospital Universitário de Goiânia, GO por bactérias Gram negativas multirresistentes, com destaque para as espécies *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. agglomerans* e *E. aerogenes*, reconhecidos como patógenos capazes de causar infecções em vários sítios anatômicos, dentre eles, corrente sanguínea, trato respiratório inferior, trato urinário e sítio cirúrgico.

A educação continuada e a conscientização da equipe multiprofissional de saúde em relação à importância da contaminação de superfícies inanimadas por bactérias potencialmente patogênicas em UTI devem ser consideradas ferramentas fundamentais no controle das IRAS.

Abstract

The inanimate surfaces of hospitals can serve as reservoir of pathogenic bacteria. In sight of this, it was aimed to isolate and identify Gram-negative rods samples from trays, beds and serum equipments of an Intensive Care Unit (ICU). The frequency, percentage and antimicrobial susceptibility profile of the isolates were also determined. Swabs humidified in 0.85% sterile saline solution were rubbed against inanimate surfaces. These swabs were inoculated in BHI broth and each positive cultures were streaked on MacConkey agar. The colonies were submitted to a biochemical evaluation and the susceptibility profiles of the isolated strains were determined by the disk diffusion method, and the antimicrobial drugs tested were: amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole and imipenem. Amongst 275 tray sample, 119 (43.3%) presented Gram-negative rods (GNR) growth, of which 111 were identified as Enterobacteriaceae (49 samples, or 44.1%) or non-fermenters (62 samples or 55.9%). From the 275 bed samples, 125 (45.5%) presented growth of GNR, and amongst these 118 were identified as: 47 (39.8%) Enterobacteriaceae and 71 (60.2%) non-fermenters. In regard to the 49 collected samples from serum equipments, 11 (22.4%) presented growth of GNR, which were identified: four (36.4%) Enterobacteriaceae and seven (63.6%) non-fermenters. The majority of the isolated bacteria presented resistance to antimicrobials and the imipenem was considered the antimicrobial with most efficient in vitro. With the emergency of GNR resistance, procedures of cleanness are imperative for the reduction of the rate of nosocomial infections in ICU.

Keywords

Gram-negative bacteria; Inanimate surfaces; Intensive Care Units; Antimicrobial resistance

REFERÊNCIAS

1. De Moraes BA, Cravo CAN, Loureiro MM, Solari CA, Asensi MD. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 2000;42(4):201-7.
2. Pereira MS, Prado MA, Sousa JT, Tipple AFV, Souza ACS. Controle de Infecção Hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva: desafios e perspectivas. *Revista eletrônica de Enfermagem (online) Goiânia.* 2000;2(1).
3. Pereira DF, Albuquerque SSS, Poletto KQ, et al. Análise da microbiota do trato urinário dos pacientes internados na UTI do Hospital Regional de Gurupi submetidos à sondagem vesical de demora. *NewsLab.* 2013;117:106-14.
4. Karabey S, Ay P, Derbentli S, Nakipoglu S, Esen F. Handwashing frequencies in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2002;50:36-41.
5. Carvalho MM, Moura MEB, Nunes MRC, Araújo TME, Monteiro CFS, Carvalho LRB. Infecções hospitalares nas Unidades de Terapia Intensiva em um hospital público. *Revista Interdisciplinar NOVAFAPI.* 2011;4(4):42-8.
6. Hsueh PR, Chen ML, Sun CC, Chen WH, Pan HJ, Yang LS, et al. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jan;8(1):63-8.
7. Abramczyk ML, Carvalho WB, Carvalho ES, Medeiros EA. Nosocomial infection in a pediatric intensive care unit in a developing country. *Braz J Infect Dis.* 2003 Dec;7(6):375-80.
8. Kac G, Podglajen I, Vaupre S, Colardelle N, Buu-Hof A, Gutmann L. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(10):852-5.
9. Renner JDP, Carvalho ED. Microrganismos isolados de superfícies da UTI adulta em um hospital do Vale do Rio Pardo - RS. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.* 2013;3(2):40-4.
10. Sales VM, Oliveira E, Célia R, Gonçalves FR, Melo CC. Análise microbiológica de superfícies inanimadas de uma Unidade de Terapia Intensiva e a segurança do paciente. *Revista de Enfermagem Referência.* 2014. nov./dez.IV(3):45-53.
11. Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev. Saúde Pública.* 2000;34(2):163-9.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ. Enterobacteriaceae (p. 177-262) e Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores (p. 263-330). *Diagnóstico Microbiológico.* 5nd ed., Medsi, Rio de Janeiro, 2001.
13. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25 v.35, n.3, 2015.
14. Menezes EA, Ferreira FC, Cunha FA, Café VS, Moreira JLB. Cepas de Pseudomonas resistentes a antimicrobianos testados no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará. *RBAC.* 2002;34(1):27-30.
15. Lucchetti-Miganeh C, Redelberger D, Chambonnier G, Rechenmann F, Elsen S, Bordi C, et al. Pseudomonas aeruginosa Genome Evolution in Patients and under the Hospital Environment. *Pathogens.* 2014 Apr 10;3(2):309-40.
16. Gonçalves CR1, Vaz TM, Leite D, Pisani B, Simoes M, Prandi MA, et al. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to Enterobacter cloacae and Enterobacter agglomerans in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000 Jan-Feb;42(1):1-7.
17. Espinal PA, Mantilla JR, Saavedra CH, Leal AL, Alpuche C, Valenzuela EM. Molecular epidemiology of nosocomial infection by extended-spectrum beta-lactamases-producing Klebsiella pneumoniae. *Biomedica.* 2004 Sep;24(3):252-61. [Article in Spanish].
18. Sousa MA, Medeiros NM, Cardoso AM, et al. Microrganismos prevalentes em hemoculturas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital escola de Goiânia, GO. *NewsLab.* 2014;126:88-94.
19. Yaman A, Tasova Y, Kibar F, Inal AS, Saltoglu N, Buyukcelik O, et al. Investigation of the antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing nosocomial infections. *Saudi Med J.* 2004 Oct;25(10):1403-9.
20. Brink AJ, Feldman C, Grolman DC, Muckart D, Pretorius J, Richards GA, et al. Appropriate use of the carbapenems. *S Afr Med J.* 2004 Oct;94(10 Pt 2):857-6.
21. Pittet D, Simon A, Hugonnet S, Pessoa-Silva CL, Sauvan V, Perneger TV. Hand hygiene among physicians: performance, beliefs, and perceptions. *Ann Intern Med.* 2004 Jul 6;141(1):1-8.
22. Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996 Jan;17(1):53-80.

Correspondência

Alessandra Marques Cardoso

Rua Tamboqui, Quadra 175, Lote 02, Apto. 604 – Parque Amazônia
74835-530 – Goiânia, Goiás

E-mail: alemarques5@yahoo.com.br

Microrganismos do ar e infecção hospitalar

Air microorganisms and hospital infection

Clarissa Feltrin¹

Bárbara Cristina Alves¹

Tania Beatriz Creczynski Pasa¹

Marcos Antônio Segatto Silva¹

Resumo

Infecção hospitalar é qualquer infecção adquirida após a internação do paciente, que se manifeste em decorrência do período de internação ou procedimentos hospitalares. A qualidade do ar está interligada à ocorrência desse tipo de infecção, assim, procurou-se identificar microrganismos presentes no ar do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC e relacionar com dados de infecção hospitalar fornecidos pelo mesmo. Com o auxílio de um amostrador de ar, de meios de cultura e de técnicas de identificação de microrganismos estabeleceu-se um comparativo entre os resultados e os dados de infecção hospitalar publicados nos boletins epidemiológicos do hospital. Foram selecionadas, para análise, áreas críticas e semicríticas, que atendem pacientes suscetíveis a infecções oportunistas. Os resultados apresentaram concentrações de microrganismos superiores à estipulada para o nível de risco na Unidade de Tratamento Intensivo, enquanto que as demais unidades encontraram-se dentro dos valores adotados como limite. Foram identificadas seis espécies e/ou gêneros distintos de bactérias e seis gêneros fúngicos nos ambientes escolhidos para o estudo, sendo que grande parte dos microrganismos também haviam sido relatados nos boletins epidemiológicos como responsáveis por infecções. Destaca-se, assim, mais um veículo e reservatório de microrganismos passível de controle para favorecer melhores condições de saúde.

Palavras-chave

Qualidade do ar; Microrganismos do ar; Infecção hospitalar

INTRODUÇÃO

Infecção hospitalar ou nosocomial é qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifeste durante este tempo, ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com o período ou procedimentos hospitalares.⁽¹⁾ Consiste em um agravo de grande significado epidemiológico dentro do contexto da assistência hospitalar e suas consequências tanto do ponto de vista humano como econômico, e que é relevante.⁽²⁾

A poluição do ar, seja ela de origem química, física ou biológica, determina, em parte, a qualidade de vida e da saúde humana. No caso específico de unidades de saúde, a qualidade do ar pode exercer uma influência direta e de grande significância na velocidade de recuperação dos pacientes e na frequência de ocorrência de infecções hospitalares.⁽³⁾ Essas condições sofrem interferências de fatores como temperatura, umidade, dos sistemas de ar condicionado, ventilação, aquecimento, da movimentação de pessoas, da concentração de partículas e de microrganismos.⁽⁴⁾

Os hospitais prestam atendimento aos pacientes cuja resistência está reduzida pela doença ou terapia utilizada. Pacientes imunocomprometidos, oncológicos, neonatos, transplantados e pacientes portadores da Aids são mais sensíveis às infecções oportunistas causadas por alguns fungos e bactérias, que normalmente não são patogênicos para indivíduos saudáveis.⁽⁵⁻⁷⁾

O Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU-UFSC é um hospital escola, totalmente público, estruturado em quatro áreas básicas (clínica médica, cirúrgica, pediatria e tocoginecologia), referência estadual em patologias complexas, clínicas e cirúrgicas com grande demanda na área de câncer e cirurgias de grande porte. Possui 300 leitos, realiza média mensal de 8.362 atendimentos de urgência/emergência e 12.645 atendimentos ambulatoriais.⁽⁸⁾

O estudo procurou identificar microrganismos presentes no ar de unidades do hospital universitário e relacioná-los com dados de infecção hospitalar disponíveis nos boletins epidemiológicos de 2008 e do primeiro semestre de 2009, publicados pela Comissão de Controle de Infecção

¹Faculdade de Farmácia - Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC, Brasil.

Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC, Brasil.

Artigo recebido em 05/11/2010

Artigo aprovado em 16/02/2016

Hospitalar (CCIH) do mesmo. Além disso, buscou enfatizar a relevância da qualidade do ar, caracterizá-lo como possível veículo e fonte de microrganismos e ressaltar a importância clínica dos patógenos oportunistas em ambientes hospitalares.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos ambientes

Embora os contaminantes do ar não se resumam apenas em contaminantes biológicos, visto que contaminações químicas e parâmetros físicos do ar também constituem fatores relacionados à contaminação, a análise efetuada restringiu-se à identificação biológica representada por bactérias e fungos.

A Unidade de Tratamento Intensivo Adulto (UTI-A), Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTI-N) e Centro Cirúrgico (CC) foram escolhidos por atender pacientes mais suscetíveis a infecções hospitalares. A Clínica Médica II (CMII) foi investigada com o objetivo de conhecer as condições do ar em uma unidade semicrítica do hospital. Ainda, a incidência significativa de infecções nosocomiais nessas unidades, como aponta o boletim epidemiológico de 2008, contribuiu com a seleção. Amostras do ar exterior foram obtidas como indicado pela resolução RE n°9 da Anvisa para fins de comparação com a microbiota encontrada nas unidades.

Meios de cultura

Para a amostragem utilizaram-se placas de Petri descartáveis estéreis com o meio de cultura agar sangue de carneiro a 5% e agar Sabouraud Dextrose a 4%, ambos descritos na norma técnica inserida na Consulta Pública n° 109, de 11 de dezembro de 2003. Para o isolamento de bactérias e fungos, os meios agar MacConkey e tubos com agar Sabouraud Dextrose a 4% também foram usados.⁽⁹⁾

Coletas de ar no ambiente hospitalar

As amostras foram coletadas no Hospital Universitário em setembro de 2009. Para o procedimento foi usado o amostrador de ar por impactação através de peneiras, conhecido como amostrador de Andersen (SKC, modelo Biostage, 1 estágio). Posteriormente à calibração do mesmo manteve-se uma vazão de 28 litros por minuto durante dez minutos, resultando na coleta de 280 litros de ar em cada placa de Petri, estando em conformidade com a norma técnica 001 da resolução RE n°9 da Anvisa.⁽⁵⁾

As coletas foram feitas em duplicata para cada ambiente em agar Sabouraud Dextrose a 4% e agar sangue de carneiro a 5%, adotando-se um único ponto de amostragem para cada área de análise, visto que nenhuma delas superava 1.000 m² de área construída, obedecendo assim às

determinações da resolução RE no 09 da Anvisa. No Centro Cirúrgico instalou-se o amostrador na lateral da sala, sendo as demais amostragens coletadas no centro dos ambientes.⁽⁵⁾

As placas com cultura de bactérias e de fungos receberam tratamentos distintos conforme disposto a seguir.

Bactérias

A incubação ocorreu em estufa entre 35°C e 37°C por aproximadamente 36 horas, sendo efetuadas as contagens das colônias em cada placa. As colônias macroscopicamente distintas foram codificadas e submetidas à coloração de Gram, permitindo a classificação das mesmas em Gram positivas (coradas em púrpura) ou Gram negativas (coradas em vermelho), como cocos e bacilos pela visualização em microscópio óptico.⁽¹⁰⁾

Para se estudarem individualmente os diferentes microrganismos, culturas únicas foram obtidas pelo isolamento das colônias em novas placas contendo meios seletivos. Posteriormente foram realizados os testes bioquímicos específicos para cada grupo de bactéria.

Testes bioquímicos

Cada colônia, de acordo com as características apresentadas, foi submetida aos testes bioquímicos de Hemólise; Catalase; Hidrólise da bile esculina (BEA); Crescimento em NaCl 6,5%; Coagulase; Citrocomo-oxidase; Prova do Vermelho de Metila (VM); Prova de Voges-Proskauer (VP); Meio IAL (Instituto Adolfo Lutz); Indol; Ornitina e Citrato recomendados pelo Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar publicado pela Anvisa.⁽¹⁰⁾

Fungos

As placas com agar Sabouraud-Dextrose foram incubadas em estufa à temperatura aproximada de 25°C por sete dias, conforme norma técnica 001 da resolução RE n°9 da Anvisa.⁽⁵⁾

Nove dias após a incubação, as colônias macroscopicamente distintas foram repicadas para tubos com agar Sabouraud-Dextrose. Os tubos permaneceram em estufa a aproximadamente 25°C por cinco dias, sendo preparadas lâminas coradas com lactofenol para análise das colônias.

As características macromorfológicas das colônias e as micromorfológicas, avaliadas através da microscopia óptica, foram empregadas para determinar os gêneros dos fungos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transmissões do ar para o paciente

Uma via de transmissão é necessária para ligar uma fonte infecciosa ao seu novo hospedeiro. Mesmo

não sendo um meio no qual os microrganismos possam crescer, o ar é um portador de poeiras e gotículas que podem carregá-los. Partículas de pó sedimentam rapidamente, já as gotículas, passíveis à evaporação da água, formam núcleos de partículas infecciosas. Esses microrganismos podem ser transportados para pequenas ou longas distâncias, sendo ressuspensos facilmente no ar. Alguns morrem em questão de segundos, outros sobrevivem por semanas, meses ou até anos.⁽¹¹⁾

Equipamentos técnicos associados ao cuidado com o paciente, terapia e diagnóstico podem romper as barreiras anatômicas, favorecendo a contaminação por microrganismos, incluindo os presentes no ar. A alteração da proteção natural e bloqueio de mecanismos de defesa do organismo, por exemplo, tosse e espirro em pacientes submetido à ventilação mecânica, também contribui para o mesmo.⁽⁷⁾

Sendo assim, procedimentos de exposição como cirurgias, uso de cateteres (venosos e vesicais), sondas, tubos, punções, aspiração, administrações parenterais ou o próprio estado de saúde do paciente favorecem a proliferação de microrganismos.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Isso comumente acontece com queimados, que apresentam a barreira epitelial destruída, expõem proteínas degradadas e tecidos desvitalizados, proporcionando maior risco de infecção.⁽¹⁵⁾ Adicionalmente, a baixa imunidade resultante de doenças como a Aids, o uso de medicamentos na terapia do câncer e doenças imunológicas, ou pacientes neonatos, também favorecem as infecções.⁽⁷⁾

Partículas e possíveis patógenos que contaminam o ar originam-se da pele, fragmentos de pelos, luvas, fumaça, reformas, roupas, fibras que compõem os campos ou até mesmo dos sistemas de ar. Para melhorar a pureza do ar, sistemas de filtros são costumeiramente utilizados. O sistema do hospital universitário é constituído de unidades do tipo "ventilador-serpentina", composto por pré-filtro grosso; filtro bolsa e filtro absoluto. Juntos possuem uma eficiência de 99,97% para partículas de até 0,3 µm. No entanto, esses filtros, acoplados ao sistema de ar condicionado, podem servir para fixação e crescimento de microrganismos caso não sejam limpos ou trocados regularmente.⁽⁶⁾

Bactérias

Contagens de bactérias por ambiente

Devido à ausência de legislação específica para bactérias, foi utilizado como base a Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003. Conforme a mesma, as unidades são classificadas de acordo com o risco de ocorrência de eventos adversos à saúde por exposição ao ar ambiental, tendo cada nível um limite de partículas biológicas por m³ (Tabela 1). A UTI-N, a área coletiva de uma UTI-A e salas de cirurgia se enquadram no nível 2. Quartos para internação de imunossuprimidos e salas de cirurgia especializada (ortopedia, neurologia, cardiologia e transplante) são enquadrados no nível 3.⁽⁹⁾

Tabela 1 - Partículas biológicas totais no ar em UFC/m³ para cada nível crítico

Variáveis e componentes	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Partículas biológicas totais no ar ambiental	≤ 750 ufc/m ³	= 500 ufc/m ³	= 200 ufc/m ³	= 50 ufc/m ³

Fonte: Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003

Dos ambientes internos analisados, a UTI-A apresentou concentração de microrganismos superior ao dobro estipulado para o seu nível de risco. Os demais valores das diferentes unidades ficaram abaixo dos adotados como referência (Gráfico 1), porém ressalta-se a seguir algumas particularidades.

A desproporção entre as placas da UTI-A pode estar relacionada à remoção de material contaminado depositado no expurgo no momento da amostragem correspondente à placa 1. Possivelmente, a sutil diferença nos valores encontrados nas placas da UTI-N atribui-se à maior circulação de pessoas durante a execução de uma das amostragens. A divergência existente entre os resultados obtidos no Centro Cirúrgico é plausível se considerada a eficiência dos insufladores de ar. Como o ar exterior sofre diversas influências ambientais torna-se relativa qualquer falta de equidade nos valores.

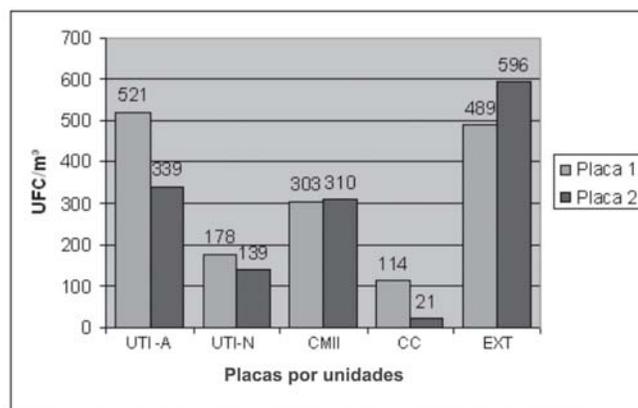


Gráfico 1. Contagem de colônias em UFC/m³ por placa e unidade avaliada. Clínica médica II (CMII) Unidade de Tratamento Intensivo Adulto (UTI - A) Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTI - N) Centro cirúrgico (CC) Ar exterior (EXT).

Bactérias encontradas em cada unidade

Da coleta resultaram 19 colônias de bactérias isoladas, que submetidas aos testes bioquímicos indicaram seis espécies e/ou gêneros distintos (Tabela 2). Algumas colônias, devido às características particulares, foram classificadas apenas como contaminantes ambientais, pois não são bactérias de importância clínica.

A UTI-A apresentou níveis de pneumonia acima dos permitidos conforme consta nos boletins epidemiológicos de 2008 do Hospital Universitário (HU). A pneumonia pode ser causada por bactérias do gênero *Klebsiella*, um gênero encontrado nas amostras obtidas na análise do ar. Essas bactérias podem causar também infecções de feridas e meningite. Ainda, 18,52% das infecções da CMII estão relacionadas à infecção pulmonar e, dos isolados feitos dos pacientes com infecção hospitalar, 18,08% relacionavam-se ao gênero *Klebsiella*.^(16,17)

A. K. pneumoniae e a *K. oxytoca* são conhecidas por causarem infecções hospitalares. Algumas cepas apresentam resistência às cefalosporinas de amplo espectro, aos monobactâmicos, como o aztreonam e aos carbapenems.⁽¹⁷⁾

As infecções do trato urinário foram a segunda maior causa de infecções nosocomiais no HU em 2008. A UTI-A apresentou 22,90% das infecções nesse sistema enquanto que a CMII exibiu 20% desse tipo de infecção. Entre os causadores de infecções do trato urinário estão bactérias do gênero *Enterococcus* e os *Staphylococcus coagulase* negativo encontradas nas amostras de ar e referidas no boletim epidemiológico de 2008.

O *Staphylococcus coagulase* negativo resultante das amostras do CC também é causador de infecções do sítio cirúrgico. No HU, 13,33% dos óbitos associados à infecção hospitalar ocorreram em pacientes previamente submetidos a procedimentos cirúrgicos.

O *Staphylococcus* sp. relatado no boletim de 2008 foi encontrado no ar da UTI-N. Esse foi isolado em dois casos de infecção hospitalar na unidade, e, dos 22 óbitos

ocorridos na mesma, cinco estavam associados a infecções nosocomiais. Dos microrganismos isolados a partir de pacientes, 11,08% correspondiam ao gênero *Staphylococcus*; destes, 7% pertencentes à espécie *S. aureus*. Este gênero ainda é causador de infecções do trato urinário, infecções em enxertos ortopédicos, osteomielites e infecções em válvulas artificiais.⁽¹⁸⁾

Tais microrganismos apresentam resistência a antibióticos como gentamicina, trimetoprima, eritromicina, cloranfenicol, metilicina, nafcilina e oxacilina e algumas cepas de *S. aureus* são resistentes à vancomicina e rifampicina.⁽¹⁸⁾

Em 2008, 2,91% dos isolados no HU correspondiam ao gênero *Enterococcus* sp. Esse gênero é um dos causadores de infecções urinárias, meningite, endocardites, infecções de feridas, pélvis e oculares;⁽¹⁹⁾ 49,85% dos isolados totais no HU foram identificados como enterobactérias, sendo 4,66% correspondentes a *E. cloacae*. Os enterococos são resistentes às cefalosporinas, penicilina e monobactâmicos.

Amostras do ar analisado ainda continham colônias de Estreptococos do grupo D e bacilos Gram positivos. O grupo dos estreptococos é composto atualmente pelas espécies *S. bovis* e *S. equinus*, tendo apenas o primeiro alguma importância médica em casos de endocardites e bacteremias em pacientes com carcinoma de cólon.^(20, 21)

Bacilos Gram positivos são formadores de esporos, representados pelas espécies de *Bacillus* e *Clostridium*, sendo que a maioria não provoca doenças e não está bem caracterizada na microbiologia médica. Sendo assim, são classificados apenas como contaminantes do ar.⁽²²⁾

Fungos*Contagens de colônias fúngicas*

A contagem não foi realizada, pois durante os sete dias de incubação das placas houve um crescimento excessivo de algumas colônias fúngicas impossibilitando a visualização clara de todas as colônias.

Tabela 2 - Bactérias encontradas por unidade e particularidades relacionadas às infecções

Bactérias	Infecções, agravos e sistemas acometidos	Unidades onde foram encontradas
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	Focais; bacteremia; sítio cirúrgico, osteomielite; trato urinário; em enxertos e próteses	UTI-A, UTI-N, CC, CMII, ambiente exterior
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cutâneas; abscessos profundos; septicemia; bacteremia; síndrome do choque tóxico	UTI-A e UTI-N
<i>Klebsiella</i> sp.	Pneumonias; septicemia; infecção de feridas; meningite	UTI-A e CMII
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cutâneas; trato respiratório; trato urinário; gastrointestinal; biliar; septicemia	UTI-A e CMII
<i>Enterococcus</i> sp.	Trato urinário; meningite; infecção e feridas; bacteremia; endocardites; oculares; trato respiratório	UTI-A, UTI-N e CMII.
Estreptococos do grupo D	Endocardites; bacteremia em casos de carcinoma de cólon	Ambiente exterior

Clinica médica II (CMII) Unidade de Tratamento Intensivo Adulto (UTI - A) Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTI - N) Centro cirúrgico (CC)

Fungos encontrados em cada unidade

Foram isoladas 29 colônias, das quais cinco gêneros fúngicos e uma levedura (*Candida* sp.) foram identificados. A análise de 13 colônias não foi conclusiva devido às limitações laboratoriais e baixa sensibilidade do método de identificação adotado, tendo sido classificados como filamentosos de acordo com suas características. O restante dos isolados repetiu os gêneros dispostos a seguir (Tabela 3).

Das 80 mil espécies de fungos descritas, menos de quatrocentas têm importância médica, sendo apenas cinquenta as espécies causadoras de 90% das infecções. As micoses podem ser classificadas em superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas. Dos fungos encontrados nas amostras de ar, todos são classificados como oportunistas. Esses afetam pacientes com doenças subjacentes graves e que apresentam comprometimento em suas defesas.⁽²³⁾

Tabela 3 - Fungos encontrados por unidade e particularidades relacionadas às infecções

Fungos	Infecções, agravos e sistemas acometidos	Unidades onde foram encontradas
<i>Penicillium</i> sp.	Ceratite micótica; endoftalmite; otomicoses; esofagite; pneumonia; endocardite; peritonite; infecção do trato urinário	CMII; CC; UTI-A; UTI-N
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergilose broncopulmonar alérgica; aspergiloma; alveolite alérgica extrínseca; sinusites; otomicoses; onicomioses; peritonite; endocardite; aspergilose invasiva	CMII; CC; UTI-N
<i>Cladosporium</i> sp.	Ceratite micótica; onicomioses; micoses cutâneas; sinusite; pneumonia; abscesso cerebral; meningite; cromomicoses	CMII; CC; UTI-A; UTI-N
<i>Trichoderma</i> sp.	Peritonite; micetoma pulmonar; hematomas peri-hepáticos; abscessos pulmonares; sinusite fúngica alérgica; hemorragia pulmonar infantil	CMII; CC; UTI-A; UTI-N
<i>Candida</i> sp.	Candidíases superficiais, cutâneas e mucosas; artrite; meningite; endoftalmite; osteomielite; endocardite; candidemia; candidomicose ungueal	CMII; CC; UTI-A
<i>Rhizopus</i> sp.	Mucormicose	CMII

Clinica médica II (CMII) Unidade de Tratamento Intensivo Adulto (UTI - A) Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTI - N) Centro cirúrgico (CC)

Os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* ou outros não foram descritos pelos boletins epidemiológicos de 2008 ou 2009, entretanto o boletim de 2008 relata que 6,13% de todas as infecções hospitalares do HU são causadas pela *Candida* sp. e 0,84% dessas infecções por *C. albicans*.

O gênero *Penicillium* sp. pode estar associado à ceratite micótica, endoftalmite, otomicoses, esofagite, pneumonia, endocardite, peritonite, e infecções do trato urinário em indivíduos imunossuprimidos.⁽²⁴⁾

O *Cladosporium* sp. é fonte de alérgenos e inclui uma variedade de fungos que dispersam seus esporos em correntes de ar.⁽²⁵⁾ Raramente patogênico, pode causar ceratite micótica e infecções no trato respiratório (podendo levar à sinusite ou pneumonia).⁽³⁾

Espécies de *Trichoderma* sp. são responsáveis por peritonite associada à diálise ambulatorial contínua e infecções em pacientes imunocomprometidos com doenças hematológicas ou que receberam transplante de órgãos sólidos e sinusite fúngica alérgica.⁽²⁶⁾ Há casos envolvendo *Trichoderma* sp. em quadros de micetoma pulmonar, hematomas peri-hepáticos, abscessos cerebrais e hemorragia pulmonar infantil.⁽²³⁾

A maioria das infecções fúngicas nosocomiais é associada à *Candida* sp., como se observa no caso do HU. A

candidíase é a micose sistêmica mais comum e os agentes frequentes são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis*. A *Candida* sp. pode infectar os rins, fixar-se em próteses valvares cardíacas, causar artrite, meningite, endoftalmite e osteomielite.⁽²⁷⁾

No hospital foram identificados importantes gêneros oportunistas causadores de doenças em áreas como UTI-N, na qual a imaturidade fagocitária mononuclear, humoral e do sistema complemento, além do desenvolvimento prematuro do estrato córneo, favorece uma maior suscetibilidade desses pacientes às infecções.⁽²⁸⁾ Até mesmo no centro cirúrgico, onde foi encontrado apenas um gênero bacteriano (*Staphylococcus coagulase* negativo), constatarem-se no mínimo cinco gêneros distintos de fungos e uma levedura. ACM II apresentou o gênero *Aspergillus*, um importante patógeno oportunista que não está presente em todas as unidades, contrapondo-se à maior parte dos gêneros identificados, encontrados em praticamente todos os setores analisados.

O *Aspergillus* sp. é responsável por casos de aspergilose broncopulmonar alérgica principalmente em pacientes com asma, aspergiloma em pacientes com histórico de tuberculose ou sarcoidose; alveolite alérgica extrínseca, sinusites fúngicas; otomicoses, peritonite,

endocardite. Na aspergilose invasiva, a partir dos pulmões a doença pode disseminar-se para o trato gastrointestinal, rins, fígado, cérebro ou para outros órgãos, originando abscessos e lesões necróticas, enquanto que infecções causadas pelo gênero *Rhizopus* são menos frequentes na clínica.⁽²³⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base neste estudo observa-se que as infecções hospitalares podem sofrer contribuição da contaminação do ar por patógenos oportunistas. Sendo assim, o controle não apenas microbiológico, mas da qualidade do ar em geral pode favorecer a melhoria do atendimento hospitalar. Esse controle pode estar inserido entre as ações exercidas pelas CCIHs, as quais incorporam atividades de políticas de prevenção de infecções. Entretanto, a existência de parâmetros de uma legislação específica aplicada para o controle da qualidade do ar em ambientes de saúde se faz necessária para a execução de tal atividade.

A vigilância, por meio da análise da qualidade do ar e ações preventivas, como a manutenção e limpeza dos sistemas de ar, juntamente com medidas relativamente simples, como a restrição do número de pessoas circulantes em cada unidade, de visitantes a áreas de maior risco, uso de paramentação adequada, limitação de abertura e fechamento de portas, melhor localização do expurgo e sistema de coleta seguro, implantação de programas educativos para conscientização dos profissionais da saúde da importância de uma conduta responsável no atendimento de imunossuprimidos e de pacientes suscetíveis, são medidas que se somam para minimizar a contaminação do ar e favorecer a melhoria da assistência à saúde.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva, do Laboratório de Controle de Qualidade; Ao Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos, do laboratório de Micologia Clínica; ao Prof. Dr. Henrique de Melo Lisboa, do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; à Prof.^a Dr.^a Tania Beatriz Creczynski Pasa, do Grupo de Estudos de interações entre Micro e Macromoléculas; à Prof.^a Dr.^a Helena Cristina Ferreira Franz Vasconcelos, do Departamento de Análises Clínicas; ao Prof. Carlos Roberto Merlin, do Departamento de Microbiologia; ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago - HU-UFSC e todos os funcionários que possibilitaram a realização deste trabalho.

Abstract

Hospital infection is any infection acquired after patient's admission, which becomes apparent as a result of hospitalization or hospital procedures. Air quality is linked to the occurrence of such infection.

Thus, we sought to identify microorganisms present in the air at the University Hospital UFSC and compare the results with data provided by the same institution. By using selective culture media for fungi, bacteria, agar plate impactor and microbial identification techniques, we settled a comparison between the results and data from epidemiological reports published by the hospital. Critical and semi critical areas were selected for this study, which support susceptible patients to opportunistic infections. The results showed a higher concentration of microorganisms set according to the level of risk at the ICU, while other units were within the values adopted as a limit. Six species and/or different genera of bacteria were identified at the chosen areas as well as six genera of fungi. Most of them had also been reported in as responsible for infections. Stands out, therefore, one more microorganism's vehicle and reservoir capable of control in order to promote better conditions of health.

Keywords

*Air qual*Air quality; *Microorganisms in the air*; *Hospital infection*

REFERÊNCIAS

1. Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. Caderno A Epidemiologia para o Controle de Infecção Hospitalar. Brasil: Ministério da Saúde; 2000.177 p.
2. Pereira MS, Moriya TM, Gir E. Infecção hospitalar nos hospitais escola: uma análise sobre seu controle. Rev Latino-am Enf, Ribeirão Preto, v. 4, n. 1, p. 45-62, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rlae/v4n1/v4n1a13.pdf>> Acesso em: 29 set. 2009.
3. Quadros ME, Lisboa HdM, Oliveira VLD, Schirmer WN. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. Eng Sanit Ambient. 2009 jul/set;431-8.
4. Silva ERSS. Avaliação microbiológica do ar em ambiente hospitalar. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, 2008. Disponível em:< <http://biblioteca.sinbad.ua.pt/teses/2009000727> > Acesso em: 23 out. 2009.
5. Brasil. Resolução - REn° 9, de 16 de janeiro de 2003. In: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), editor. Brasil 2003.10 p.
6. Aguiar Ed. Introdução à microbiologia clínica e ao tratamento das doenças infecciosas 2009. 96 p.
7. NIH (National Institutes of Health). Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. United States: National Institutes of Health; 2007. 47 p.
8. Santa Catarina. Projeto de Telessaúde. In: Secretaria de Estado da Saúde, Florianópolis 2007.
9. Brasil. Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003. In: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), editor. Brasil 2003.
10. Brasil. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: Módulo V Detecção e identificação de bactérias de importância médica. In: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Brasília 2000. 96 p.
11. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia - Conceitos e aplicações. 2 ed. São Paulo: Pearson; 1997. 517 p.
12. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. In: Department of Health and Human Services, United States 2009.198 p.
13. Larsen MK, Thomsen TR, Moser C, Hoiby N, Nielsen PH. Use of cultivation-dependent and independent techniques to assess contamination of central venous catheters: a pilot study. BMC Clin Pathol. 2008 Oct 28;8:10.
14. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. Respir Care. 2005 Jun;50(6):725-39.

15. Piette A, Blot S, Vandewoude K, Vogelaers D. Incidence and mortality of systemic fungal infection in burned patients. *Burns*. 2009 Nov;35(7):1052-3.
16. CDC. *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. United States: Department of Health and Human Service; 2009.
17. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J Perinatol*. 2003 Sep;23(6):439-43.
18. Cordeiro DNdG. Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília -DF. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
19. Anvisa. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica Módulo V. Brasil 2004. 93 p.
20. Tripodi MF, Fortunato R, Utili R, Triassi M, Zarrilli R. Molecular epidemiology of *Streptococcus bovis* causing endocarditis and bacteraemia in Italian patients. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Oct;11(10):814-9.
21. Tjalsma H, Schöller-Guinard M, Lasonder E, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW. Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: diagnostic antigens from *Streptococcus bovis*. *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2127-35.
22. Turnbull. PCB. *Bacillus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Galveston 1996. 17 p.
23. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 24 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2009. 820 p.
24. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. 530 p.
25. Mitakakis T, Ong EK, Stevens A, Guest D, Knox RB. Incidence of *Cladosporium*, *Alternaria* and total fungal spores in the atmosphere of Melbourne (Australia) over three years. *Aerobiologia*. 1997; 13:83-90.
26. Chouaki T, Lavarde V, Lachaud L, Raccurt CP, Hennequin C. Invasive Infections Due to *Trichoderma* Species: Report of 2 Cases, Findings of In Vitro Susceptibility Testing, and Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 2002 Dec 1;35(11):1360-7.
27. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Oct;9(4):499-511.
28. Mussi-Pinhatal MM, Rego MA. Immunological peculiarities of extremely preterm infants: a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2005 Mar;81(1 Suppl):S59-68. [Article in Portuguese].
26. Storpirtis S, et al. *Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007. 528 p.
27. United States. Department of Health and Human Service. Centers of Disease Control and Prevention. *Klebsiella Pneumoniae*, mar. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_kp_about.html> Acesso em: 10 out. 2009.

Correspondência

Clarissa Feltrin

Faculdade de Farmácia - Bioquímica
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário – Trindade
88010-970 – Florianópolis, SC, Brasil
E-mail: clarissa.f87@hotmail.com

Avaliação de resíduos de antimicrobianos em leite UHT adquiridos no comércio de São José do Rio Preto

Evaluation of antibiotic residues in UHT milk commercialized in São José do Rio Preto

Adriana Antônia da Cruz Furini¹

Juliana Campos de Oliveira²

Roberta Santos Souza²

Gabriel Mathias Carneiro Leão³

Gislaine Silveira Simões⁴

Cleide Aparecida Silveira Momesso⁵

Resumo

Introdução: Atualmente, o leite UHT (*Ultra High Treatment*) é o mais utilizado pela população brasileira devido à sua praticidade, facilidade de armazenamento e longo prazo de validade. No entanto, os resíduos de antimicrobianos originários do manejo inadequado de drogas para o controle de mastites e doenças do trato reprodutivo do gado leiteiro são de maneira frequente detectados no leite, tanto no Brasil como em outros países. **Metodologia:** Foram analisadas 26 amostras de leite UHT do tipo C, de 13 fabricantes diferentes para presença de resíduos de penicilina G e sulfadiazina pelo teste qualitativo de inibição do crescimento microbiano. **Resultados:** Dentre as amostras de leite, 70% apresentaram resultado positivo (n= 18), 15% resultado negativo (n=4) e 15% resultado inconclusivo (n=4). **Conclusão:** O kit comercial Delvotest® foi eficaz para triagem de resíduos de antimicrobianos, com a presença de 70% de positividade para amostras de leite UHT analisadas. Esse índice é preocupante e sugestivo da insatisfatória qualidade do produto.

Palavras-chave

Leite UHT; Resíduos de antimicrobianos

INTRODUÇÃO

Os resíduos de antimicrobianos são detectados no leite com bastante frequência, tanto no Brasil como em outros países.⁽¹⁾ A principal fonte desses resíduos no leite é o manejo inadequado de drogas utilizadas no controle de mastites e doenças do trato reprodutivo do gado leiteiro, que podem ser decorrentes de diferentes vias de administração⁽¹⁻³⁾ e por uso fraudulento.⁽⁴⁾ Esses resíduos podem estar presentes nos tecidos musculares dos animais ou ser eliminados pelo leite durante o período de carência do medicamento, sendo necessário o descarte dessa produção.⁽¹⁻⁷⁾ Entre esses medicamentos, a classe dos β -lactâmicos é a mais utilizada para tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo, assim, encontrada com maior frequência no leite.^(1,7) Adicionalmente, os antimicrobianos são usualmente utilizados de forma ilegal como agentes na preservação e redução da carga microbiana do leite.⁽¹⁾

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode causar vários efeitos indesejáveis, com risco à saúde do consumidor e interferência na produção de derivados lácteos.^(1,3,8) Dentre as consequências para o consumidor, tem-se a seleção de cepas bacterianas resistentes⁽⁴⁾ como reportadas para o *Staphylococcus aureus*, a hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos a essas substâncias, além do desequilíbrio da microbiota intestinal e efeito teratogênico.^(2,3,9-13) Além disso, aproximadamente 5% a 10% da população é hipersensível à penicilina e apresentam reações alérgicas ao ingerirem concentrações de 1 ppb dessa substância. Ademais, a estreptomicina pode acarretar problemas de audição.^(1,3,9) Quanto aos problemas referentes à indústria de derivados do leite, os resíduos de antimicrobianos podem inibir a multiplicação de culturas lácticas utilizadas na produção de queijos e iogurtes e, ainda, reduzir a produção de ácidos e sabores na manteiga e queijos.^(1,5,8,9,12)

¹Farmacêutica bioquímica, Prof^a Mestre do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²Discente do curso de Farmácia do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Biólogo, Prof. Mestre do Instituto Federal do Paraná – Campus Jacarezinho – Jacarezinho, PR, Brasil

⁴Tecnóloga em Alimentos, Prof^a. Mestre do Instituto Federal do Paraná – Campus Jacarezinho – Jacarezinho, PR, Brasil

⁵Bióloga, Hospital de Base de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Artigo recebido em 08/02/2011

Artigo aprovado em 16/02/2016

Os consumidores têm mostrado diferentes níveis de tolerância para resíduos de antibióticos no leite, portanto, a execução e o acompanhamento de programas que garantam a qualidade em todas as fases da manipulação e processamento do leite são cruciais.⁽¹⁴⁾ Nesse cenário, tanto no Brasil, como em outros países, o controle de resíduos de antimicrobianos no leite tem sido monitorado e, em âmbito nacional, a Instrução Normativa nº 51/2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento proíbe a industrialização do leite oriundo de animais submetidos a tratamento medicamentoso.^(3,11,15) Desta maneira, é exigida a pesquisa mensal de resíduos de antimicrobianos no leite em laboratórios autorizados, os quais não devem ser superiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) previstos para cada grupo químico específico.^(1,3,14)

Vários kits analíticos para detecção desses resíduos estão disponíveis no mercado. Estes são fundamentados em diferentes princípios de ação e detecção, tais como inibição de crescimento microbiano, afinidade por receptores na parede celular de microrganismos, método de bioluminescência, entre outros.^(1,3) No entanto, a maioria dos testes comercialmente disponíveis são do tipo qualitativo, classificados como testes de triagem.^(7,16)

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, com 32 mil toneladas por ano.^(4,17) O leite Longa Vida representou 6,125 bilhões de litros do leite produzido em 2012, enquanto que o pasteurizado teve queda de 12%. A praticidade faz com que o leite UHT seja amplamente consumido pela população de diferentes idades e níveis socioeconômicos.^(14,17) Ademais, é fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas. As características nutricionais, fazem desse alimento um meio de cultivo de microrganismos.⁽¹²⁾

Técnicas imunoenzimáticas (SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclina),⁽¹⁸⁾ cromatográficas e de sensibilidade aos antimicrobianos, entre outras, podem ser utilizadas para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.⁽⁴⁾ O Delvotest® é baseado na inibição do crescimento de *Bacillus stearothermophilus* e mudança de pH do meio.^(4,19) Na ausência de resíduos de antimicrobianos ocorre a multiplicação bacteriana, produção de ácido e alteração da cor original do indicador (de púrpura para amarelo). Na presença de resíduos de antimicrobianos, a multiplicação bacteriana é retardada ou inibida, ocorrendo inibição ou acidificação pobre do meio (tonalidade púrpura a azulada). A coloração entre o violeta e o amarelo é considerada inconclusiva, pois é indicativa da presença de inibidores da reação.^(3,8,19)

Considerando-se que os resíduos são resistentes ao calor, que as temperaturas utilizadas no processo UHT são ineficazes para eliminá-los, e ainda a relevância para a indústria de derivados lácteos e para a saúde pública, o objetivo dessa pesquisa foi a investigação de resíduos

de antimicrobianos em amostras de leite industrializado pelo processo UHT adquiridas no comércio da cidade de São José do Rio Preto, região Noroeste paulista.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo, amostragem, local do estudo

O estudo realizado foi do tipo prospectivo, no período de fevereiro a abril de 2010. Foram escolhidas aleatoriamente 13 marcas de leite UHT do tipo C de origem bovina, provenientes de quatro supermercados de São José do Rio Preto. Para cada marca foram amostrados dois lotes distintos, totalizando 26 amostras.

As amostras de leite foram armazenadas em refrigeração monitorada de 2° a 8°C e, no dia seguinte à coleta, analisadas no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique", Unidade Universitária II do Centro Universitário de São José do Rio Preto - UNIRP.

Resíduos de antimicrobianos no leite

Para determinação de possíveis resíduos de antimicrobianos no leite utilizou-se o teste qualitativo Delvotest® SP NT fabricado pela DSM Food Specialties,⁽¹⁹⁾ e a análise foi efetuada conforme as especificações do fabricante. Os antimicrobianos e limites de detecção do kit são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Limite de detecção em parte por bilhão de antimicrobianos pelo teste Delvotest® SP-NT

Antimicrobiano	Limite de detecção (ppb)
Penicilina G	1 - 2 ng/mL
Sulfadiazina	25 - 50 ng/mL

Fonte: Delvotest® SP NT

A separação da alíquota de leite para análise foi realizada de forma asséptica com tubos estéreis em capela de fluxo laminar vertical classe A1. A detecção de resíduos por este método utiliza ampolas de meio de cultura contendo o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* e, como indicador de pH, o púrpura de bromocresol.^(8,19) Foram adicionados 100 µL da amostra de leite com pipeta descartável na ampola do kit, e essas foram mantidas durante três horas em banho-maria com temperatura de 64°C (+/-0,5°C).

RESULTADOS

Os resultados de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite UHT analisadas estão apresentados na Figura 1. Observou-se que 70% das amostras apresentaram resultado positivo (n= 18), 15% negativo (n=4) e 15% inconclusivo (n=4).

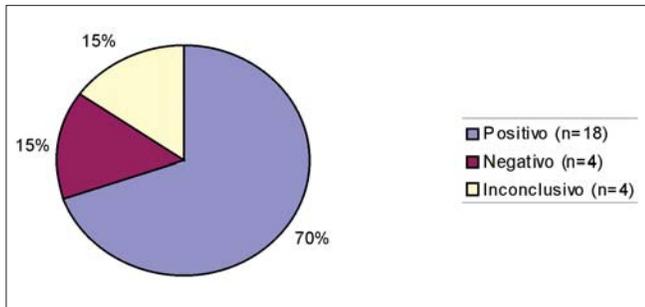


Figura 1. Frequência de resíduos de antibióticos no leite UHT detectados pelo teste Delvotest®.

DISCUSSÃO

Metodologias de inibição microbiana são os testes mais rotineiros para a triagem de resíduos de antimicrobianos no leite em decorrência da rapidez de execução, praticidade e sensibilidade de detecção de várias classes terapêuticas.⁽⁴⁾ A importância da pesquisa de resíduos no leite e sua obrigatoriedade, de acordo com a Instrução Normativa nº 51, justificam-se por diversos danos à saúde pública e indústria de laticínios.^(8,15) Os leites UHT analisados nesse estudo apresentaram alto índice de resíduos de antimicrobianos (70%). Este resultado sugere o uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças do gado leiteiro e conseqüente não obediência ao período de carência dos medicamentos. Tais fatores podem acarretar na insatisfatória qualidade do leite UHT.^(2,16)

Outros trabalhos que também apresentaram resultados preocupantes foram os realizados por Moraes et al.⁽⁷⁾ e Nascimento et al.⁽²⁾ No primeiro, utilizando kits imunoenzimáticos, os autores testaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 57 amostras de leite pasteurizado do tipo B e C do comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro, no qual os autores verificaram que 44% das amostras foram positivas para tetraciclina; 3,5% para β -lactâmico e 7% para estreptomicina; No estudo de Nascimento et al.,⁽²⁾ realizado em Piracicaba, na análise de 96 amostras de leite de seis diferentes marcas dos tipos B e C, 50% apresentaram substâncias antimicrobianas, das quais 34,8% dos resíduos eram de β -lactâmicos.

Por outro lado, no monitoramento realizado pela Anvisa, de 2004 a 2005, por meio do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), das 306 amostras de leite UHT e leite em pó, nenhuma apresentou ocorrência de β -lactâmicos tetraciclina e neomicina. No entanto, 5% apresentaram resíduos de cloranfenicol, medicamento proibido no Brasil para animais de consumo.^(14,19-21)

Nossos resultados foram amplamente superiores aos encontrados por esse programa e também pelos descritos por Nero et al.⁽¹⁾ que investigaram a presença de antibióti-

cos em 210 amostras de leite cru coletado em quatro diferentes áreas produtoras no Brasil, utilizando um método qualitativo (Charm Test®), obtendo somente 11,4% de positividade (n=24).

Outro estudo, com índices inferiores aos verificados em nossa pesquisa, foi o realizado por Ribeiro et al.⁽⁸⁾ no interior do estado de São Paulo, com o mesmo kit desse estudo (Delvotest TM DSM). Estes autores analisaram leite orgânico de 148 animais, com 2,7% de positividade para resíduos de antimicrobianos. Esse baixo índice pode, de certa forma, ser justificado pelo fato de que, nesse sistema, em caso de processos infecciosos e uso de terapia medicamentosa, o leite ser descartado durante um período duas vezes maior que o de carência convencional.

Adicionalmente, Fonseca et al.,⁽¹⁴⁾ verificando a presença de resíduos em cem amostras de leite UHT, de diferentes estados, obtiveram positividade em somente 4% utilizando o método 'rápido iogurte' de procedência mineira. A prevalência de mastite subclínica nos bovinos do Brasil em geral é associada a: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus*, *Bacillus* e *Enterobacter* spp. (trombete 2014).

Apesar dos resultados obtidos nesse estudo serem qualitativos, e do *Codex Alimentarius* (FAO – Food and Agriculture Organization) estabelecer limites máximos de resíduos (LMR) permitidos em alimentos, tal metodologia oferece como vantagens a rápida e fácil execução.⁽¹²⁾ Dessa maneira, este teste poderia ser utilizado como triagem para avaliação do leite e, assim, as amostras positivas poderiam ser encaminhadas para testes mais específicos com detecção dos tipos e concentrações desses resíduos.

A presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras analisadas avalia um cenário no qual os programas de monitoramento são necessários, e que produtores rurais e fabricantes prezem pelas boas práticas agropecuárias para obtenção de melhor qualidade no leite e seus derivados.

Os resíduos de antimicrobianos podem ser decorrentes da terapêutica da mastite em vacas em lactação ou tratamento durante o período seco como preventivo, e do não cumprimento dos prazos mínimos de carência para a comercialização.⁽⁵⁾ Outra origem menos provável poderia ser a contaminação de maneira voluntária do produto para que o período de validade possa ser aumentado.⁽¹²⁾

CONCLUSÃO

O kit comercial Delvotest® foi eficaz para triagem de resíduos de antimicrobianos, com a presença de 70% de positividade para amostras de leite UHT analisadas. Esse índice é preocupante e sugestivo da insatisfatória qualidade do produto. Portanto, medidas mais eficazes devem ser exigidas, devido à facilidade de exposição do consumidor a substâncias nocivas. Alimentos de origem animal, como

o leite, podem ser contaminados durante a produção, processamento, transporte e comercialização, quer seja por microrganismos patogênicos, ou por outras substâncias tóxicas.

Abstract

Introduction: Currently, UHT (Ultra High Treatment) milk, is the most used by the Brazilian population due to its practicality, ease of storage and long shelf life. However, the antimicrobial residues originated from inadequate management of drugs for control of mastitis and diseases of the reproductive tract of dairy cattle are often way detected in milk, in Brazil, like other countries. **Methodology:** We analyzed 26 samples of UHT milk type C, of 13 different manufacturers for the presence of penicillin G and sulphadiazine by qualitative test of inhibition of microbial growth. **Results:** Among the milk samples, 70% were positive ($n = 18$), 15% negative ($n = 4$) and 15% inconclusive results ($n = 4$). **Conclusion:** The commercial kit Delvotest® was effective for screening of antibiotic residues in the presence of 70% positivity for UHT milk samples analyzed. This index is worrisome and suggestive of unsatisfactory product quality.

Keywords

Antimicrobial residues; UHT Milk.

REFERÊNCIAS

- Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Franco BDGM. Antimicrobial residues in raw milk from Brazilian milk-producing regions. *Ciênc Tecnol. Aliment.* 2007;27(2):391-3.
- Nascimento GGF, Maestro V, Campos MSP. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev. Nutrição.* 2001;14(2):119-24.
- Tenório CGMSC, Cerqueira MMOP, et al. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009;61(2):504-10.
- Trombete FM, Santos RR, Souza ALR. Antibiotic residues in Brazilian milk: a review of studies published in recent years. *Rev Chil Nutr.* 2014;41(2):191-7.
- Costa AS, Lobato V. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea uht por teste de inibição microbiana comercial. *Rev Inst Latic.* 2009;64(367/368):72-6.
- Brito RB, Junqueira RG. Determination of beta-lactam residues in milk by high performance liquid chromatography. *Braz arch biol technol.* v.49 spe Curitiba jan. 2006.
- Morais CMQJ, Durães TS, Nóbrega AW, Jacob SC. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, n.01, p. 33-35, mai., 2009.
- Ribeiro MG, Geraldo JS, Langoni H, Lara GH, Siqueira AK, Salerno T, et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* 2009;29(1):52-8.
- Folly MM, Machado SCA. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Rural* vol.31 no.1 Santa Maria Jan./Feb. 2001.
- Medeiros ES, Mota RA, Santos MV, Freitas MF, Pinheiro Júnior JW, Teles JA. Perfil de sensibilidade micorbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq Vet Bras.* 2009;29(7):569-74.
- Nero LA, Viçosa GN, Pereira FEV. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2009;29(2):386-90.
- Martin JGP. Resíduos de antimicrobianos no leite - uma revisão. *Segurança alimentar e nutricional.* 2011;18(2):80-7.
- Ruela ICA, Lima JA, Souza SVC, Junqueira RG. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2005;25(1):139-46.
- Fonseca GP, Cruz AG, et al. Antibiotics residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. 2009;29(2):451-3.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/InstrucaoNormativa51.pdf> Acesso em 28 mar. 2006.
- Santos MV. Antibióticos: como não deixar resíduos no leite. *Balde Branco*, São Paulo-SP460, p.54-57, 03 fev, 2003.
- ABVL. Associação Brasileira da Indústria do Leite Longa Vida. Disponível em: <http://www.ablv.org.br/implistcontentint.aspx?id=792&area=imp-not>. Acesso em: 23 out 2015.
- Araújo MMP. Validação e métodos imunoenzimáticos para determinação de resíduos de antimicrobianos no leite. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. pp. 46 2010.
- Devotest.® SP-NT/SP MINI-NT. Disponível em: http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/dairy-home.htm. Acesso em: 12 jan 2010.
- Brasil. Anvisa. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório 2004/2005. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. Brasília, 2006. 45p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf> Acesso em: 20 mar. 2010.
- Oliveira NC, Bando E, Machinski Junior M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado no estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci. Health Sci;* 2007;29(1):59-62.

Correspondência

Adriana Antônia da Cruz Furini

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416

Centro de Investigação de Microrganismos – Vila São Pedro

15090-000 – São José do Rio Preto, SP

E-mail: adriana.cruz.furini@gmail.com

Atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)

Antimicrobial activity and phytochemical study of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)

Antonio Marcos Saraiva¹
Cristiane Lopes Saraiva²
Admário Marques Gonçalves²
Haroudo Satiro Xavier³
Maria Nelly Caetano Pisciotano²

Resumo

Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos: hexânico, acetato de etila e metanólico de diferentes partes de *Schinopsis brasiliensis* usando métodos de poços e de concentração mínima inibitória difusão em agar e análise fitoquímica. Os resultados obtidos mostraram que os extratos acetato de etila e metanólico das folhas, flor, casca do caule e raiz e do endocarpo e exocarpo do fruto de *S. brasiliensis* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ATCC 9723, AM-31) *Enterococcus faecalis* (ATCC 33186, AM-128), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502, AM-206), *Salmonella* spp. serotipo Montevideo (ATCC 8387, AM-149), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Flavonoides, esteroides, terpenoides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas e açúcares redutores foram detectados na análise fitoquímica.

Palavras-chave

Schinopsis brasiliensis; Atividade antimicrobiana; Análise fitoquímica

INTRODUÇÃO

A cura de várias doenças através das plantas e a origem do conhecimento sobre as propriedades dos vegetais confunde-se com a própria história humana, práticas estas que constituíram no passado a medicina do homem primitivo. Tais propriedades proporcionam o desenvolvimento de vários medicamentos, sejam estes obtidos por síntese, a partir de molécula protótipo, ou através do isolamento dos constituintes naturais.^(1,2)

A planta *Schinopsis brasiliensis* Engl. é uma espécie característica das caatingas e de grande valor econômico para a região nordestina. É uma árvore endêmica brasileira popularmente conhecida como "Braúna", "Baraúna",⁽³⁾ "Braúna-do-sertão" e "Braúna-parda". Tem seu uso na medicina popular como anti-histérica e neurastênica,⁽⁴⁾ anti-inflamatório e antisséptico.⁽⁵⁾

Foram isolados a partir dos extratos hexânicos e clorofórmicos do caule de *S. brasiliensis*, aquil e alquenil fenóis, galato de metila, também esteroides (β -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, estigmast-4-em-ona-6- β -ol e 5 α , 8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol), triterpenos,⁽⁶⁾ (2*R**, 3*R**, 2''*R**, 3''*R**)-7-hidroxi-4'-methoxi-flavanona (3 \rightarrow 3''')-3''',7''-dihidroxi-4'''-metoxi-flavanona, 4,2',4'-

trihidroxi-chalcona-(3 \rightarrow O' \rightarrow 4'')2''', 4''',-dihidroxi-chalcona, galato de metila, ácido gálico, (6*R*,9*R*)-megastigma-4-en-3-one-9-O- β -glicopiranosídeo, quercetin-3-O- β -D-xilopiranosídeo e tricetin-3'-O- β -D-glicopiranosídeo.⁽⁷⁾

MATERIAL E MÉTODOS

A planta foi coletada na cidade de Carnaubeira da Penha, Sertão de Pernambuco, latitude: 08°19'09", longitude: 38°44'41" e altitude: 446 metros,⁽⁸⁾ entre os meses de março e julho de 2004, sendo então identificada pela curadora do Herbário IPA, Dra. Rita de Cássia Pereira e depositada no mesmo, sob registro de n° 70.007.

As partes da planta (folha, casca do caule, casca da raiz, flor, semente, endocarpo e exocarpo da vagem) foram trituradas, pesadas e então feitas três extrações sucessivas (exceto semente, endocarpo e exocarpo do fruto, somente em metanol) pelo processo de decocção. A extração, dos triturados das plantas citadas anteriormente, foi iniciada com o n-hexano, em seguida acetato de etila e, por último, metanol. Cada solvente, seguindo a sequência citada anteriormente, permaneceu em extração por um período aproximado de 72 horas, sendo então a solução extrativa vertida completamente em um filtro de papel e o

¹Faculdade São Francisco da Paraíba – FASP – Cajazeiras, PB, Brasil.

²Laboratório de Análises Microbiológicas

³Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil.

Artigo recebido em 07/03/2011

Artigo aprovado em 16/02/2016

próximo solvente incorporado à planta para uma nova extração, no sentido do solvente menos polar para o mais polar. Os extratos filtrados foram levados à concentração no rota-vapor a vácuo (45° C), e então pesados.

As sete bactérias estudadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, AM103), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P, AM106), *Salmonella* spp serotipo Montevideo (ATCC 8387, AM149), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031, AM50), *Escherichia coli* (ATCC 9723, AM-31), *Enterococcus faecalis* (ATCC 33186, AM128) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502, AM206).

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE. ATCC: *American Type Culture Collection*.

Os inóculos foram preparados em solução salina 0,9% estéril, a partir de cultura de 24 horas em agar caseína de soja, obtendo turvação de 10^8 UFC.mL⁻¹, em comparação com a escala 0,5 de McFarland.⁽⁹⁾

A atividade antimicrobiana dos extratos de *S. brasiliensis* foram estudadas por dois métodos analíticos. O primeiro avaliou a formação de halo de inibição produzido pelo extrato, por meio da técnica de poços difusão em agar e o segundo investigou a Concentração Mínima Inibitória (CMI) pela técnica de diluição em agar.

Os extratos secos oriundo de extração metanólica foram preparados em Água:DMSO (1:1 v/v),⁽¹⁰⁾ e aqueles extraídos em acetato de etila e n-hexano em Água:Tween 80 (4,8:0,2 v/v). O antibiótico padrão para ambas as técnicas foi a tetraciclina (TT) a 300 µg.mL⁻¹ para a técnica de poços/difusão em agar, e para determinação do CMI foram as concentrações de 0,31 µg.mL⁻¹ a 640 µg.mL⁻¹ por placa (fator de diluição = 2).

As diluições dos extratos para determinação do halo de inibição e CMI foram, respectivamente, 100 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹ e 312,5 µg.mL⁻¹ a 2.103 µg.mL⁻¹ (fator de diluição 2).

Foram feitas soluções controle dos adjuvantes (DMSO 50% e Tween 80,4%, para a técnica de poços/ difusão em agar e CMI).

O semeio das bactérias foi realizado em meio agar Mueller-Hinton, prosseguindo com a perfuração dos poços (diâmetro de 6 mm), e aplicado 100 µl/poço das diluições obtendo-se 10 mg e 5 mg/poço, tetraciclina 30 µg/poço e 100 µl/poço da solução controle de DMSO 50%. A medida dos halos são a média de dupla análise.

As diluições dos extratos foram incorporados ao meio agar Mueller Hinton, na proporção de (9:1 v/v), obtendo-se diluições de 31,25 µg/ml a 2000 µg/ml.

Os microrganismos foram inoculados assepticamente na superfície do meio de cultura com as diluições, já incorporados, e, então, incubaram-se a 37°C ± 1 por 24 horas.

Foram realizados controles das cepas, meio de cultura e dos adjuvantes (DMSO 5% e Tween 0,4%).

O ensaio foi realizado em duplicata.

As análises cromatográficas foram feitas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em Sílica Gel (Merck-Germany, 105553) e desenvolvidos por diferentes sistemas cromatográficos, para averiguar a presença ou ausência, utilizando-se padrões como controle; monoterpenos (timol), triterpenoides (β-amirina e ácido ursólico), esteroides (β-sistosterol), saponinas, açúcares (glicose), flavonoides (quercetina e canferol), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e galato de metila), fenilpropanoides, alcaloides (pilocarpina), cumarinas, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (Catequina) (Tabela 1).

RESULTADOS

Os extratos obtidos a partir de diferentes solventes tiveram seus respectivos rendimentos determinados (Tabela 2).

Tabela 1. Partes da planta estudadas, solventes utilizados e cálculo de rendimento

Parte da Planta	Baraúna	Solventes	Sigla	Pesos (g)		Rendimento (%)
				Planta	Extrato	
Folha		Hexano	BFH	212,5	2,6	1,22
		Acetato de Etila	BFA		10,6	4,99
		Metanol	BFM		28,3	13,32
Casca do caule		Acetato de Etila	BCA	833,2	3,9	0,47
		Metanol	BCM		42,5	5,10
Casca da Raiz		Acetato de Etila	BRA	291,2	3,7	1,27
		Metanol	BRM		18,3	6,29
Endocarpo da Vagem		Metanol	BENM	240,2	6,4	2,66
Exocarpo da Vagem		Metanol	BEXM	195,8	5,4	2,75
Flor		Hexano	BFLH	331,3	3,5	1,06
		Acetato de Etila	BFLA		8,3	2,51
		Metanol	BFLM		13,2	3,98
Semente		Metanol	BSM	252,4	7,2	2,85

Tabela 2. Sistemas cromatográficos utilizados para *screening* fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Metabólitos	Sistema de Eluição	Revelador	Referência
Alcaloides	A	Dragendorff	(24)
Triterpenos e Esteroides	B	Liebermann Burchard	(12)
Iridoides	A	Vanilina Sulfúrica	(24)
Saponinas	A	Anisaldeído	(25)
Açúcares	C	Trifeniltetrazólio	(15)
Cumarinas	D	U.V	(25)
Derivados Cinâmicos	A	NEU	(25)
Flavonoides	A	NEU	(24, 14)
Fenilpropanoglicosídeos	A	NEU	(25)
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	A	Vanilina Clorídrica	(17)

A-AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v); B- AcOEt -HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 0.5 : 0.5 : 0.5 v/v); C- n-BuOH-Me₂CO-Tampão Fosfato pH = 5 (40 : 50 : 10 v/v); - Et₂O-tolueno-AcOH 10% (50 : 50 : 50 v/v)

Fitoquímica

O perfil fitoquímico dos diferentes extratos de *Schinopsis brasiliensis* evidenciaram a presença de compostos fenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos (ácido gálico e galato de metila) e esteroides (Sitosterol), e derivados cinâmicos. Os ácidos fenólicos presentes na folha e flor (ácido elágico), canferol na casca da raiz, quercetina no endocarpo do fruto. Triterpenos (Amirina)

presente nas folhas, açúcares (glicose) em toda a planta, exceto folha. Por outro lado, não foi encontrada a presença de cumarina, saponina, fenilpropanoides, iridoides e quinonas (Tabela 3).

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* Engl. foram apresentados nas Tabelas 4 e 5. Os extratos hexânicos da folha e flor, únicos testados, não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações ensaiadas.

Tabela 3 - Resultado da Triagem fitoquímica de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Metabólitos secundários	Partes de <i>Schinopsis brasiliensis</i> (MeOH)						
	Folha	Casca do Caule	Casca da Raiz	Endocarpo do Fruto	Exocarpo do Fruto	Semente	Flor
Alcaloides	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Triterpenos	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+
Esteroides	+	+	+	+	+	+	+
Iridoides	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Açúcares redutores	(-)	+	+	+	+	+	(-)
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Derivados Cinâmicos	+	+	+	+	+	+	+
Ácidos Fenólicos	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+
Fenilpropanoides	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Proantocianidinas Condensadas	(-)	+	+	+	(-)	(-)	(-)
Leucoantocianidinas	(-)	(-)	(-)	+	(-)	(-)	(-)

+: Presença do correspondente metabólitos secundário; (-): ausência do correspondente metabólitos secundário; MeOH: metanol

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das partes de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

	FM			CM			RM			ENM			EXM			FLM			SM		TET					
	Poços			Poços			Poços			Poços			Poços			Poços			Poços		Poço					
Cepas	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	10	5	CMI	30	CMI
AM31	25	24	1000	-	-	1000	-	-	>2000	15	12	2000	11	-	>2000	11	-	1000	-	-	>2000	23	1			
AM50	25	23	500	23	21	1000	24	23	500	26	17	2000	16	14	>2000	23	21	250	19	16	>2000	30	0,5			
AM103	22	21	500	21	19	1000	20	19	500	24	18	2000	19	17	1000	23	20	500	21	19	>2000	25	0,5			
AM128	22	18	1000	12	11	2000	18	16	2000	20	18	2000	18	16	2000	20	17	500	21	17	>2000	26	0,5			
AM149	25	22	500	14	-	1000	12	10	1000	15	11	>2000	11	-	2000	16	13	>2000	15	14	>2000	29	0,5			
AM206	22	20	500	12	-	1000	11	-	2000	18	16	1000	16	15	>2000	14	12	250	18	16	>2000	17	1			

Poços: mg/poço; nt : não testado; -: Não houve halo de inibição; CMI: µg/mL; F: Folha; C: Casca do Caule; R: Casca da Raiz; EN: Endocarpo do fruto; EX: Exocarpo do fruto; FL: Flor; S: Semente; M: Metanol; AM103: *S. aureus*, AM128: *E. faecalis*, AM206: *P. aeruginosa*, AM31: *E. coli*, AM50: *K. pneumoniae*, AM149: *Salmonella* spp.); TET: Tetraciclina; AM - Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas - Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos em acetate de etila das partes de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

	FA			CA			RA			FLA			TET	
	Poços			Poços			Poços			Poços			Poço	
Cepas	10	5	CMI	30	CMI									
AM31	12	-	>2000	-	-	>2000	12	-	>2000	13	-	>2000	23	1
AM50	21	20	>2000	14	11	500	16	-	500	20	17	2000	30	0,5
AM103	19	17	2000	22	18	250	15	11	>2000	21	16	>2000	25	0,5
AM128	20	17	>2000	12	11	2000	13	12	>2000	13	-	>2000	26	0,5
AM149	17	13	>2000	14	-	nt	13	12	>2000	20	18	>2000	29	0,5
AM206	18	16	500	13	11	>2000	15	14	>2000	15	12	>2000	17	1

Poços: mg/poço; nt : não testado; -: Não houve halo de inibição; CMI: µg/mL; F: Folha; C: Casca do Caule; R: Casca da Raiz; EN: Endocarpo do fruto; EX: Exocarpo do fruto; FL: Flor; S: Semente; M: Metanol; AM103: *S. aureus*, AM128: *E. faecalis*, AM206: *P. aeruginosa*, AM31: *E. coli*, AM50: *K. pneumoniae*, AM149: *Salmonella* spp.); TET: Tetraciclina; AM - Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas - Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana de um extrato é determinada pela medida do halo de inibição deste frente à bactéria testada⁽¹¹⁾ e a classificação quanto ao potencial antimicrobiano tomou como referência os parâmetros de Alves et al.⁽¹²⁾ – halos de inibição < 9 mm são inativos; entre 9 e 12 mm, pouco ativos; de 13 a 18 mm, ativos; > 18 mm, muito ativos) e Saraiva et al.⁽¹³⁾ – CMI < 100 µg/mL, é classificado como muito ativo; CMI entre 100 e 500 µg/mL, ativo; CMI > 500 e ≤ 1000 µg/mL, moderadamente ativo; CMI > 1000 e ≤ 2000 µg/mL, pouco ativo; e aqueles com CMI > 2000 µg/mL, inativos.

Outro ponto é que os extratos oriundos de extração em acetato de etila e hexano não obtiveram halo de inibição, ou os halos de inibição foram, na maioria das vezes, inferiores aos dos extratos de extração metanólica. Isso pode ser devido à ausência de constituintes com atividade antimicrobiana ou estes estão presentes em quantidade insuficiente para provocar um halo de inibição. Ainda,

a causa de menor atividade antimicrobiana pode ser justificada pelas características químicas do próprio extrato, como pela presença de cera, que aumenta a viscosidade do extrato dificultando a difusão dos constituintes, ficando retido no disco ou no poço.⁽¹⁴⁾

Referente aos parâmetros citados anteriormente, podem-se classificar os halos de inibição da fração metanólica da folha (FM) com as melhores médias de halos de inibição obtidos, da ordem de 22 mm a 25 mm e 18 mm a 24 mm frente às cepas de *E. coli* (AM31), *E. faecalis* (AM128), *Salmonella* spp. (AM149), *P. aeruginosa* (AM206), *S. aureus* (AM103) e *K. pneumoniae* (AM50), para as concentrações de 10 mg e 5 mg por poço, respectivamente, classificados como muito ativos,⁽¹²⁾ exceto na menor concentração frente à cepa de *E. faecalis*, que foi ativo (Tabela 4 e 5).

Na determinação das CMI das frações de *S. brasiliensis* (Tabela 4 e 5) foram observados os menores valores de CMI, classificadas como ativas,⁽¹³⁾ em relação ao extrato metanólico da flor (FLM), com valores de 250 µg/mL e

500 µg/mL, respectivamente, diante de *K. pneumoniae* (AM50), *P. aeruginosa* (AM206) e *E. faecalis* (AM128), *S. aureus* (AM103), seguido pelo extrato metanólico das folhas (FM), com CMI de 500 µg/mL em relação a *Salmonella* spp. (AM149), *K. pneumoniae* (AM50), *P. aeruginosa* (AM206) e *S. aureus* (AM103). O extrato da casca do caule extraído com acetato de etila (CA) mostrou uma CMI de 500 µg/mL e 250 µg/mL em relação a *K. pneumoniae* (AM 50) e *S. aureus* (AM103), respectivamente, sendo o melhor resultado diante de *S. aureus*.^(13,15)

Os extratos hexânicos das folhas e flor de *S. brasiliensis* não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações ensaiadas.

A atividade antimicrobiana dos vários extratos das partes de *Schinopsis brasiliensis*, em particular, das folhas e casca do caule que apresentaram atividade antimicrobiana diante de bactérias Gram positivas e Gram negativas, também demonstrado por Saraiva et al.⁽¹³⁾ e Chaves et al.⁽¹⁵⁾ pode ser justificada pela alta concentração de taninos no gênero *Schinopsis*,⁽¹⁶⁾ inclusive na espécie de *Schinopsis brasiliensis* Engl., como também apresenta flavonoides,^(7,13,17) entre estes, as quercetinas. Ainda, ácidos fenólicos, como ácido gálico, galato de metila, ácido elágico^(18,19) e sitosterol. Catequina e proantocianidinas foram encontrados no endocarpo do fruto, terpenos⁽¹⁾ nas folhas, na casca do caule⁽⁶⁾ e raiz, estes identificados usando-se padrões de referência.

CONCLUSÃO

Os extratos da folha, flor, endocarpo e exocarpo do fruto, semente, casca da raiz e casca do caule de *S. brasiliensis* apresentaram uma boa atividade antimicrobiana, diante das linhagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico ensaiadas.

Dentre todos os extratos de *S. brasiliensis*, aqueles das folhas, flores e casca da raiz e o extrato da casca do caule extraído com acetato de etila apresentaram melhores CMIs, o que justificou maiores estudos com o objetivo de identificar os metabólitos secundários com potencial antimicrobiano. O cumprimento deste objetivo foi iniciado com a elaboração e aprovação de um projeto de doutoramento, que tem como um dos objetivos isolar e identificar alguns dos constituintes ativos das folhas de *S. brasiliensis* Engl. e determinarmos seu potencial antimicrobiano.

Agradecimentos

A todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram na concretização deste trabalho.

Abstract

This work evaluated the antimicrobial activity of n-hexane, ethyl acetate, and methanolic extracts from different parts of *Schinopsis brasiliensis* using wells and minimal inhibitory concentration agar diffusion methods and the phytochemical screening. The results obtained showed that the ethyl acetate and methanol from the leaves, flower, bark of the stem, peel of the root and endocarp and exocarp of the fruit of *Schinopsis brasiliensis* presented antimicrobial activity against *Escherichia coli* (ATCC 9723, AM-31) *Enterococcus faecalis* (ATCC 33186, AM-128), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502, AM-206), *Salmonella* spp. serotype Montevideo (ATCC 8387, AM-149), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Flavonoids, steroids, terpenoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins and reducers sugars were detected in the phytochemical analysis.

Keywords

Schinopsis brasiliensis; Antimicrobial activity; Phytochemical analysis

REFERÊNCIAS

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct;12(4):564-82.
2. Coutinho HDM, Bezerra DA, Lobo K, Barbosa IJF. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. Conceitos. 2004;3:78-85.
3. Cardoso MP, David JM, David JP. AA new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. Nat Prod Res. 2005 Jul;19(5):431-3.
4. Braga R. Plantas do Nordeste - Especialmente do Ceará. 4ª Edição. Natal, Editora Universitária da UFRN, 1960.
5. de Albuquerque UP. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. J Ethnobiol Ethnomed. 2006 Jul 26; 2:30.
6. Cardoso MP. Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae). 2001. 106 p. Dissertação Instituto de Química - UFBA. Salvador.
7. Cardoso MP, Lima LS, David JP, Moreira BO, Santos EO, David JM, Alves CP. A New Biflavonoid from *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae). J Braz Chem Soc. 2015;26(7):1527-31.
8. MME (Ministério de Minas e Energia). Diagnóstico do município de Carnaubeira da Penha. Disponível em: < <http://www.cprm.gov.br/rehi/atlas/pernambuco/relatorios/CDPE041.pdf>>. Acessado em 10 Nov. 2015.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão. Ed. 23, n. 1: 33, 2003.
10. Markhan KR. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982.
11. Lenette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual de microbiologia clínica. Editorial Medica Panamericana, 4ª ed, Buenos Aires, 1987.
12. Alves TM, Silva AF, Brandão M, Grand TS, Smânia E, Smânia Jr A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 May-Jun;95(3):367-73.
13. Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). Afr J Pharm Pharmacol. 2011; 5:1724-31.
14. Virtuoso S, Davet A, Dias JFG, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd, Fabaceae (Leguminosae). Rev. Bras. Farmacogn. 2005;15:137-42.

15. Chaves TP, Dantas IC, Felismino DC, Vieira KVM, Clementino E LC, Costa LS. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. *BioFar*. 2011;5(2):11-7.
16. Roux DG, Paulus E. Condensed tannins. 8. The isolation and distribution of interrelated heartwood components of *Schinopsis* spp. *Biochem J*. 1961 Apr;78:785-9.
17. Siqueira CF, Cabral DL, Peixoto Sobrinho TJ, de Amorim EL, de Melo JG, Araújo TA, de Albuquerque UP. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:434782.
18. Fernandes FHA, Batista RSA, Medeiros FD, Santos FS, Medeiros ACD. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. *Rev. bras. farmacogn*. 2015;25(3):208-11.
19. Souza ON. Chemical Constituents of the Leaves of *Schinopsis brasiliensis*, 1990. Thesis. (Doctor of Philosophy). The Polytechnic of North. London. 207 p.

Correspondência

Antônio Marcos Saraiva

Faculdade São Francisco da Paraíba – FASP

58900-000 – Cajazeiras, PB, Brasil

Fone/Fax: 83- 3531-3011

E-mail: saraivas2@yahoo.com.br

Caracterização dos pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Campina Grande, Paraíba, no período de 2001 a 2008

Characterization of patients diagnosed with Hansen's Disease at the Campina Grande city, Paraíba, in the period of 2001 to 2008

Augusto César Marques Garcia¹

Patrícia Maria de Freitas e Silva²

Maria do Socorro Ramos de Queiroz²

Elília Maria Pombo de Farias Santiago³

Thamara Rodrigues Melo⁴

Resumo

A hanseníase é causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório, com afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos. Na Paraíba, a hanseníase assume proporções preocupantes. Nos últimos anos, vêm sendo detectados em média cerca de 970 casos novos da doença em cada ano. Diante deste contexto este trabalho teve como objetivo estudar pacientes com hanseníase em uma unidade de referência no município de Campina Grande, no período de 2001 a 2008. Foi realizado um estudo retrospectivo, longitudinal, documental e descritivo com cem pacientes do Serviço de Referência em hanseníase do município citado entre 2001 e 2008. A faixa etária mais frequente foi de 45 a 54 anos com 20,0%. Os homens foram mais afetados que as mulheres. Foram atendidos mais pacientes da zona urbana do que da zona rural. Ocorreu uma incidência de 76,0% de casos multibacilares e 24,0% de paucibacilares. A forma clínica Dimorfa foi a mais encontrada com 39,0% dos casos. Dentre os pacientes avaliados, a Baciloscopia apresentou mais resultados positivos (39,0%). Com este trabalho, concluiu-se que existe uma necessidade de ações de saúde pelas autoridades com o intuito de minimizar a incidência desta doença tão prevalente ainda no Brasil.

Palavras-chave

Mycobacterium leprae; Hanseníase; Pacientes

INTRODUÇÃO

A milenar doença hanseníase, denominada durante muitos séculos por lepra, ainda traz contemporaneamente arraigada ao seu nome o preconceito e discriminação dos que a desenvolvem. Esta situação é originada basicamente em função da generalizada falta de informação por parte da população ao seu respeito.⁽¹⁾

A hanseníase é causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, ou bacilo de Hansen, que é um parasita intracelular obrigatório, com afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos, que se instala no organismo da pessoa infectada, podendo se multiplicar. O tempo de multiplicação do bacilo é lento, podendo durar de 11 a 16 dias. O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto, só poucas adoecem.⁽²⁾

O homem é reconhecido como única fonte de infecção (reservatório), embora tenham sido identificados animais naturalmente infectados.⁽²⁾ A doença não é hereditária, pois não é possível passar o material genético de uma geração a outra. Porém, a maior suscetibilidade a ela é geneticamente herdada, por isso os filhos dos pacientes de hanseníase têm mais facilidade de contrair a doença do que o cônjuge, dentro do mesmo ambiente domiciliar.⁽³⁾

A classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade baseados nas características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da Hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculoide (T) e virchoviano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D).⁽⁴⁾

¹Graduando em Farmácia pela Faculdade de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Campina Grande, PB, Brasil.

²Prof.^a MSc. do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Campina Grande, PB, Brasil.

³Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Campina Grande – Paraíba, Brasil.

⁴Farmacêutica pela Faculdade de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Campina Grande, PB, Brasil.

Trabalho desenvolvido no Centro de Referência em hanseníase de Campina Grande - Paraíba, Brasil.

Artigo recebido em 13/06/2011

Artigo aprovado em 16/02/2016

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a hanseníase como um problema de saúde pública, principalmente nos países cujas taxas de prevalência ultrapassam um caso por 10 mil habitantes.⁽⁵⁾ Entre os 11 países considerados de maior endemicidade pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a Índia ocupa o 1º lugar, e o Brasil, o 2º lugar em números de casos detectados.⁽⁶⁾

O diagnóstico da hanseníase é baseado em alguns sinais cardinais, como a presença de anestesia em lesões cutâneas, sugestivas da doença, o espessamento de nervos periféricos, e a demonstração do *M. leprae* no esfregaço de linfa ou cortes histológicos de tecidos.⁽⁴⁾ A baciloscopia da linfa é o exame complementar mais útil no diagnóstico, considerado padrão-ouro; é de fácil execução e baixo custo. Colhe-se o material a ser examinado (raspado de tecido dérmico) nos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo e em lesão suspeita. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen e apresenta o resultado sob a forma de índice baciloscópico da linfa (IBL), numa escala que vai de 0 a 6+, dependendo do número de bacilos observados por campo à microscopia.⁽⁷⁾ O exame baciloscópico também nos mostra quantitativamente a presença de bacilos íntegros (viáveis), que são evidenciados intensamente corados. A quantidade de bacilos íntegros (viáveis) em cem bacilos totais expressa o índice morfológico.⁽⁸⁾

O tratamento da doença é feito por meio dos esquemas de poliquimioterapia preconizados pela OMS: para pacientes paucibacilares, composto de seis doses, com 100 mg diárias de dapsona e dose supervisionada de 600 mg mensais de rifampicina; para os multibacilares, dose diária de 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina, e dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina e 300 mg de clofazimina, no total de 12 doses.⁽⁹⁾ Além dos antibióticos, o tratamento demanda uma disciplina que altera muitos hábitos do paciente, exigindo abstinência de bebidas alcoólicas e exercícios físicos diários para os tendões e filamentos nervosos, principalmente dos membros superiores a inferiores. Os antibióticos são fornecidos gratuitamente pelo Centro de Saúde que acompanha a evolução do tratamento, exigindo a presença mensal do paciente.⁽¹⁰⁾

Na Paraíba, a hanseníase assume proporções preocupantes. Nos últimos anos, vêm sendo detectados, em média, cerca de 970 casos novos da doença em cada ano, o que caracteriza um estado de média endemicidade e franca expansão da patologia.⁽¹¹⁾ A distribuição da endemia no estado, em relação ao que ocorre no país, também não se apresenta de forma homogênea. A maior concentração ocorre nos centros urbanos, mais especificamente em suas periferias.⁽¹²⁾

Do ponto de vista clínico, interessa se o resultado da baciloscopia é negativo ou positivo, uma vez que isso implicará a escolha do esquema terapêutico e o tempo de

tratamento. O paciente com baciloscopia positiva deve ser tratado com 12 doses de poliquimioterapia, enquanto que aquele classificado como Paucibacilar (PB) e com baciloscopia negativa é tratado com seis doses.^(2,13)

Segundo Barreto et al.,⁽¹⁴⁾ dar o diagnóstico final da hanseníase, ou a classificação do paciente hansenico na forma clínica correta, nem sempre é tão simples. Um diagnóstico correto da forma clínica deveria se basear em cinco critérios: morfologia das lesões, baciloscopia, histopatologia, imunologia (reação de Mitsuda e sorologia) e evolução clínica.^(14,15)

O objetivo deste trabalho foi analisar a relação entre a forma clínica da hanseníase e o resultado da baciloscopia em pacientes consultados no Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande, Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo, longitudinal, documental e descritivo, com cem pacientes portadores de hanseníase atendidos no ambulatório do Serviço de Referência em hanseníase no município de Campina Grande, Paraíba, no período de 2001 a 2008.

As variáveis sociodemográficas estudadas foram: idade, gênero e zona de habitação e as variáveis clínicas: classificação operacional, classificação de Madri e baciloscopia.

Após a gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do município citado ter assinado um termo autorizando a pesquisa, os dados foram coletados a partir de prontuários de cada paciente nos arquivos do Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande, Paraíba e transcritos para um formulário individual elaborado especificamente para a pesquisa contendo questões abertas e fechadas. Foram consideradas apenas as informações indispensáveis ao estudo.

Foram incluídos todos os pacientes de ambos os sexos, sem limite de idade e/ou classe social e que tiveram o diagnóstico clínico confirmado e registrado junto ao serviço de referência. Foram excluídos do estudo os pacientes encaminhados para realizar o diagnóstico e que não o tiveram concluído no referido período.

Os dados foram tabulados e analisados de forma descritiva por meio do *software* da Microsoft® (Microsoft Office 2010 - Word e Excel) e apresentados através de figuras e/ou tabelas em números e/ou porcentagens. Diante das variáveis quantitativas, foi realizada uma análise, confrontando os dados obtidos com os da literatura científica.

RESULTADOS

Foram analisadas as fichas do total de cem pacientes atendidos no ambulatório do Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande, PB no período de 2001 a

2008, e, com relação à idade dos pacientes, foi observado, conforme demonstrado na Figura 1, que a faixa etária mais frequente foi a de 45 a 54 anos (20,0%), seguida da de 55 a 64 anos (19,0%), enquanto que a faixa etária de 0 a 14 anos (3,0%) foi a menos frequente, juntamente com os indivíduos com idade superior a 75 anos (3,0%).

A Figura 2 mostra o total de casos de hanseníase segundo o gênero no período em estudo. Foi observada uma superioridade do gênero masculino (65,0%) sobre o feminino (35,0%).

Outro parâmetro estudado foi o tipo de zona de habitação em que reside o paciente com hanseníase atendido no ambulatório do Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande, PB. A zona urbana (96,0%) foi bastante superior à zona rural (4,0%), conforme dados demonstrados na Figura 3.

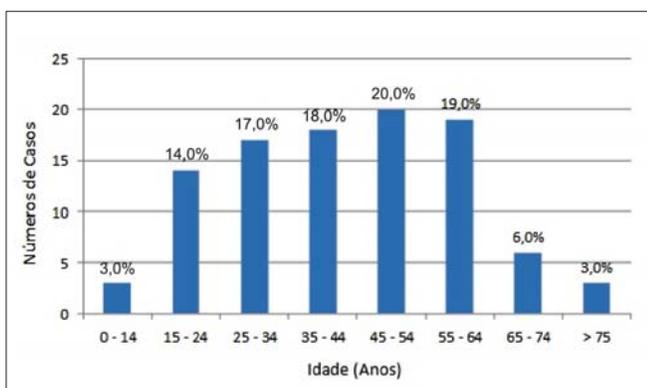


Figura 1. Casos de hanseníase atendidos no período de 2001 a 2008, segundo a faixa etária.

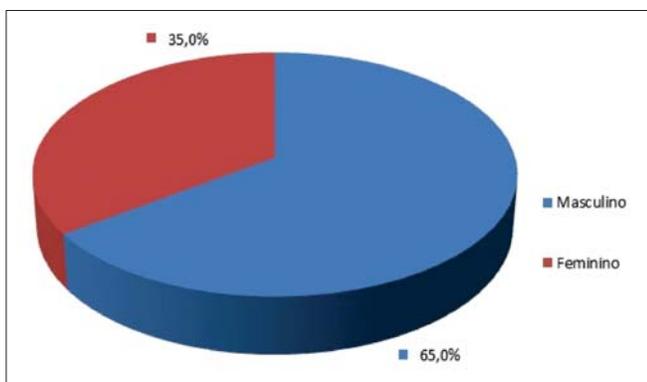


Figura 2. Casos de hanseníase atendidos no período de 2001 a 2008, segundo o gênero.

Na Tabela 1 observamos, quanto à classificação operacional, que os casos multibacilares (76,0%) foram predominantes sobre os casos paucibacilares (24,0%) ao longo do período estudado.

De acordo com a classificação de Madri (1953), demonstrada na Tabela 2, a forma clínica mais encontrada foi a Dimorfa (39,0%), seguida da Virchowiana (37,0%), Tuberculoide (17,0%) e Indeterminada (7,0%).

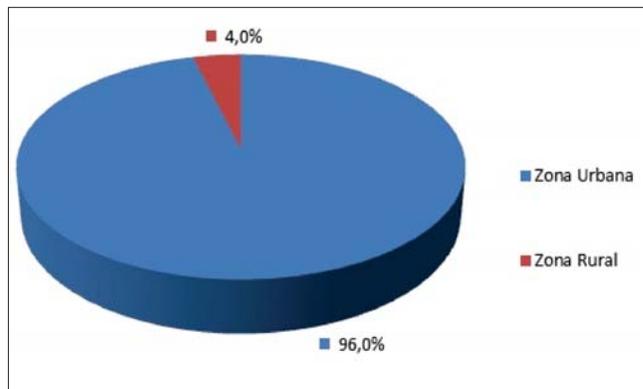


Figura 3. Casos de hanseníase atendidos no Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande no período de 2001 a 2008, segundo a zona de habitação.

Tabela 1 - Casos de hanseníase atendidos no Serviço de Referência em Hanseníase de Campina Grande no período de 2001 a 2008, segundo a classificação operacional

Classificação Operacional	n	%
Paucibacilar (PB)	24	24,0
Multibacilar (MB)	76	76,0
Total	100	100,0

Tabela 2 - Casos de hanseníase atendidos no Serviço de Referência em Hanseníase de Campina Grande no período de 2001 a 2008, segundo a classificação de Madri

Forma Clínica	n	%
Tuberculoide	17	17,0
Virchowiana	37	37,0
Indeterminada	7	7,0
Dimorfa	39	39,0
Total	100	100,0

A baciloscopia deu positiva em 39,0% dos pacientes avaliados, negativa em 38,0% e, em 23,0% dos pacientes analisados, não havia nenhum registro com relação ao exame baciloscópico. Nos pacientes com forma clínica Tuberculoide, a baciloscopia não apresentou resultados positivos; 8,0% tiveram baciloscopia negativa e 9,0% desses pacientes não tinham registro sobre o resultado da baciloscopia. Já nos pacientes com a forma clínica Virchowiana ocorreu uma grande porcentagem de baciloscopias positivas (24,0%), superando as baciloscopias negativas (9,0%), e 4,0% não tinham registros. Nos casos dos pacientes portadores da forma clínica Indeterminada, a baciloscopia não apresentou resultados positivos, 4,0% desses pacientes tiveram baciloscopia negativa e 3,0% estavam sem registro com relação ao exame baciloscópico. E, por último, os casos com forma clínica Dimorfa, dos quais 15,0% dos pacientes apresentaram baciloscopia positiva, 17,0% tiveram resultado negativo e 7,0% desses pacientes não tinham registro no tocante à baciloscopia, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição em número e porcentagem da baciloscopia entre os pacientes atendidos no Serviço de Referência em Hanseníase de Campina Grande no período de 2001 a 2008

Baciloscopia	Positiva		Negativa		Sem Registro		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Forma Clínica								
Tuberculoide	0	0,0	8	8,0	9	9,0	17	17,0
Virchowiana	24	24,0	9	9,0	4	4,0	37	37,0
Indeterminada	0	0,0	4	4,0	3	3,0	7	7,0
Dimorfa	15	15,0	17	17,0	7	7,0	39	39,0
Total	39	39,0	38	38,0	23	23,0	100	100,0

DISCUSSÃO

Neste trabalho verificou-se que a faixa etária mais frequente do total dos pacientes avaliados foi a de 45 a 54 anos com vinte casos (20,0%). Longo & Cunha⁽¹⁶⁾ e Mello et al.,⁽¹⁷⁾ estudando o perfil de pacientes hanseníacos no Mato Grosso do Sul e em Santa Catarina, respectivamente, também encontraram resultados semelhantes. Esse dado é relevante porque esses pacientes têm contato mais intenso com grande parte da população, o que contribui para a disseminação da doença.^(13,18) Além disso, esses pacientes estão na fase economicamente ativa e correm o risco de exclusão da cadeia produtiva por conta de incapacidades como consequência de uma provável demora no diagnóstico.⁽¹⁹⁾ Evidenciaram-se, também, indivíduos com idade inferior ou igual a 14 anos acometidos pela doença, sugerindo tanto uma exposição precoce ao bacilo quanto condições de alta transmissibilidade, determinada pela maior endemicidade.^(6,13,20,21)

Foi observada, também, uma superioridade de pacientes do gênero masculino (65,0%) sobre os pacientes femininos (35,0%). Esse dado foi compatível aos encontrados na literatura, em especial nos trabalhos de Lima et al.,⁽²²⁾ estudando pacientes com hanseníase no Distrito Federal, e Gomes et al.,⁽⁵⁾ avaliando pacientes de Ribeirão Preto, SP; no entanto, divergindo desses estudos e de outros de âmbito nacional, Lana et al.⁽²³⁾ encontraram maior frequência na população feminina. O predomínio da doença no gênero masculino poderia traduzir uma maior oportunidade de contato social entre os homens, além de um exame clínico menos cuidadoso em mulheres.^(22,24)

Outro dado revelado foi com relação à zona de habitação do paciente atendido em Campina Grande, PB. A prevalência dos pacientes da zona urbana (96,0%) foi bastante superior em relação aos da zona rural (4,0%), concordando assim com o estudo de Mello et al.,⁽¹⁷⁾ realizado na região Sul de Santa Catarina.

Com relação à classificação operacional, a forma Multibacilar obteve uma frequência de 76,0%, ou seja, muito superior à forma Paucibacilar, esta com apenas 24,0%. No estado do Maranhão, Aquino et al.,⁽²⁵⁾ estudando tam-

bém pacientes com hanseníase, encontraram uma prevalência dos casos multibacilares (MB) sobre os paucibacilares (PB), fato este evidenciado também por Lastória et al.⁽²⁶⁾ estudando pacientes com hanseníase da cidade de Botucatu, SP. Esse dado é muito importante, pois são os casos multibacilares (MB) a principal fonte de transmissão da doença, pois apresentam elevada carga bacilar na derme e em mucosas e podem eliminar bacilos no meio exterior.⁽⁶⁾ A ocorrência de predomínio da classificação operacional multibacilar leva a admitir que a estrutura atualmente mobilizada no combate à hanseníase esteja trabalhando de maneira estática, com uma demanda passiva de pacientes já antigos.⁽⁶⁾

De acordo com a classificação no Brasil, as quatro formas de manifestação da hanseníase são: Indeterminada, Tuberculoide, Dimorfa e Virchowiana.⁽⁶⁾ Neste estudo, os resultados encontrados para essa classificação foram: eses: Forma Indeterminada (7,0%), Tuberculoide (17,0%), Dimorfa (39,0%) e Virchowiana (37,0%). O baixo percentual da forma Indeterminada (7,0%) juntamente com a alta incidência da forma Dimorfa (39,0%) demonstram atraso no diagnóstico, permitindo inferir que a unidade básica de saúde não vem detectando os casos nas formas iniciais da doença, ocorrendo uma evolução para as formas Virchowiana ou Dimorfa.^(6,21,27,28)

Fleury et al.,⁽²⁹⁾ em São Paulo, descreveram um caso de um indivíduo em que uma única lesão, de aparência Tuberculoide, era a única manifestação da doença. Foi realizada biópsia da lesão, que evidenciou hanseníase multibacilar. Após 15 dias de tratamento com PQT/MB (poliquimioterapia para multibacilar), houve aparecimento abrupto de pápulas e placas eritemato-edematosas em todo o corpo, ulceração no local da lesão inicial, e aparecimento de úlceras em perna esquerda associadas à febre, anorexia, astenia e cefaleia, sugerindo que a ação bacteriostática/bactericida dos medicamentos agiu sobre bacilos instalados em outras áreas cutâneas, os quais, ao se fragmentarem, expuseram determinantes antigênicos que estimularam a reatividade imunocelular e a exteriorização clínica.⁽³⁰⁾

Diante da importância da baciloscopia, foram encontradas, neste trabalho, 39,0% de baciloscopias positivas, distribuídas somente nas formas clínicas Dimorfa e Virchowiana, 38,0% de negativas distribuídas nas quatro formas clínicas e 23,0% dos pacientes estavam sem registro de informações a respeito da baciloscopia. Esses resultados divergem dos encontrados no estudo de Lana et al.,⁽³¹⁾ onde ocorreram mais pacientes com resultados negativos no tocante à baciloscopia.

Já esses 23,0% de pacientes que estavam sem registro de informações com relação à baciloscopia provocam questionamentos com relação aos critérios utilizados para classificar pacientes em determinada forma clínica da

doença, já que a baciloscopia ainda é um dos sinais cardinais para conclusão do diagnóstico, exceto onde a baciloscopia não está disponível.^(32,33)

CONCLUSÃO

A faixa etária mais frequente entre os pacientes hansenícos avaliados foi a de 45 a 54 anos. Com relação ao gênero dos pacientes, os homens foram mais acometidos pela hanseníase do que as mulheres. No Serviço de Referência em hanseníase são atendidos também mais pacientes provenientes da zona urbana do que da zona rural.

De acordo com a classificação operacional, a forma Multibacilar foi mais frequente do que a forma Paucibacilar.

Quanto à classificação de Madri, a forma clínica Dimorfa foi a de maior prevalência, seguida da Virchowiana, posteriormente a Tuberculoide e, por último, a forma clínica Indeterminada.

Dentre os pacientes avaliados ocorreu um número maior de resultados positivos com relação à baciloscopia do que resultados negativos, como também ocorreu uma porcentagem de pacientes sem registro do resultado da baciloscopia.

Portanto, os dados levantados nesta pesquisa reforçam a importância da realização de estudos regionais, para se conhecer melhor a distribuição da doença em cada localidade, podendo assim auxiliar tanto o profissional da saúde quanto o próprio paciente na prevenção e cura da doença.

Agradecimentos

À Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Campina Grande, PB, por ter autorizado a realização desta pesquisa, e também à equipe do Serviço de Referência em hanseníase de Campina Grande, PB, por ter, gentilmente, cedido as informações necessárias para a realização deste estudo.

Aprovação do Comitê de Ética

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB (CAAE - 0103.0.133.000-11), em conformidade com as diretrizes éticas da pesquisa com seres humanos, recomendadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), expressas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).⁽³⁴⁾

Abstract

Hansen's disease is caused by Mycobacterium leprae which is an obligate intracellular parasite with affinity by skin cells and peripheral nerve cells. In Paraíba, hansen's disease causes concern. In recent years, it has been detected on average about 970 new cases each year. Given this context this work had as objective to study patients with hansen's disease in a unit of reference in Campina Grande city, in the period of 2001 to 2008. It was carried out a retrospective, longitu-

dinal, descriptive and documental study with 100 patients of the Reference Service to Hansen's disease in the city of Campina Grande between 2001 and 2008. The age group most frequent was of 45 to 54 years with 20,0% of the cases. The men are more affected than women. Are treated more patients from urban area than rural area. There was an incidence of 76,0% of multibacillary cases and 24,0% of paucibacillary. The Borderline clinical form was the most frequent with 39,0% of cases. Among the patients evaluated the Bacilloscopy showed more positive results (39,0%). With this work, we conclude that there is a need for health actions by authorities with the purpose of reducing this disease still so common in Brazil.

Keywords

Mycobacterium leprae; Hansen's disease; Patients

REFERÊNCIAS

1. Borenstein MS, Padilha MI, Costa E, Gregório VRP, Koerich AME, Ribas DL. Hanseníase: estigma e preconceito vivenciados por pacientes institucionalizados em Santa Catarina (1940-1960). Rev. Brasileira de Enfermagem. 2008;61(esp): 708-12.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para controle da hanseníase. Brasília, 2002.
3. Minuzzo DA. O homem paciente de hanseníase (lepra): representação social, rede social familiar, experiência e imagem corporal. 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado em Políticas de Bem - Estar em perspectiva: evolução, conceitos e actores) - Universidade de Évora, Évora.
4. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina. 1997;30:325-34.
5. Gomes FG, Frade MAC, Foss NT. Úlceras cutâneas na hanseníase: perfil clínico-epidemiológico dos pacientes. An. Bras. Dermatol. 2007;82(5):433-7.
6. Lima HMN, Sauaia N, Costa VRL, Neto GTC, Figueiredo PMS. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase atendidos em Centro de Saúde em São Luís, MA. Rev. Bras. Clin. Med. 2010;8(4):323-7.
7. Moreira AS, Santos RCR, Bastos RR, Silva JV, Santos PM. Baciloscopia da conjuntiva no diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de hanseníase. Arq Bras Oftalmol. 2006; 69(6):865-9.
8. Costa HC, Souza LCD, Martini JP, Ferrazoli L, Martins MC, Opromolla DVA, Giudice ACD. Estudo comparativo das variantes do método de coloração de micobactérias. Hansen Int. 1988;13 (2):37-41.
9. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Vol. I e II. Brasília; 2002.
10. Queiroz MS, Carrasco MAP. O Doente de hanseníase em Campinas: Uma Perspectiva Antropológica. Cad. Saúde Públ. 1995;11(3): 479-90.
11. Paraíba. Secretaria de Estado da Saúde. Gerência Executiva em Vigilância em Saúde. Relatório de Gestão 2008. João Pessoa, 2009.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório da situação da Paraíba. Brasília, 2006.
13. Sarubi JC. Estudo comparativo das técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico de quatro e seis sítios em casos novos de hanseníase, em serviço de referência de Belo Horizonte. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
14. Barreto JA, Carvalho CV, Filho MC, Garbino JA, Nogueira MES, Soares CT. hanseníase multibacilar com baciloscopia dos esfregaços negativa: a importância de se avaliar todos os critérios antes de definir a forma clínica. Hansen. Int. 2007;32(1):75-9.

15. Hastings RC, editor. Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994, p. 193-224.
16. Longo JOM, Cunha RV. Perfil clínico-epidemiológico dos casos de hanseníase atendidos no hospital universitário em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, de janeiro de 1994 a julho de 2005. *Hansen. Int.* 2006;31(1): 9-14.
17. Mello RS, Popoaski MCP, Nunes DH. Perfil dos pacientes portadores de hanseníase na Região Sul do Estado de Santa Catarina no período de 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2003. *ACM: arq. catarin. med.* 2006;35(1):29-36.
18. Bühler-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1991-5.
19. Batista ES, Campos RX, Queiroz RCG, Siqueira SL, Pereira SM, Pacheco TJ, et al. Perfil sociodemográfico e clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em Campos dos Goytacazes, RJ. *Rev. Bras. Clin. Med.* 2011;9(2):101-6.
20. Hinrichsen SL, Pinheiro MRS, Jucá MB, Rolim H, Danda GJN, Danda DMR. Aspectos epidemiológicos da hanseníase na cidade de Recife, PE em 2002. *An. Bras. Dermatol.* 2004;79(4):413-21.
21. Imbiriba EB, Hurtado-Guerrero JC, Garnelo L, Levino A, Cunha M G, Pedrosa V. Epidemiological profile of leprosy in children under 15 in Manaus (Northern Brazil), 1998-2005. *Rev. Saúde Pública.* 2008;42(6):1021-6.
22. Lima MAR, Prata MO, Moreira D. Perfil da hanseníase no Distrito Federal no período de 2000 a 2005. *Com. Ciências Saúde.* 2008; 19(2):163-70.
23. Lana FCF, Lima RF, Araújo MG, Fonseca PTS. Situação epidemiológica da hanseníase no município de Belo Horizonte/MG - Período 92/97. *Hansen. Int.* 2000;25(2): 121-32.
24. Lombardi C, Suarez REG. Epidemiologia da Hanseníase. In: Talhari S, Neves RG. org. *Hanseníase.* Manaus: Gráfica Tropical; 1997, p. 127-136.
25. Aquino DMC, Caldas AJM, Silva AAM, Costa JML. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2003;36(1): 57-64.
26. Lastória JC, Putinatti MSMA, Diório SM, Trino LM, Padovani CR. Índices Baciloscópicos e Morfológico na hanseníase após doze doses do esquema poli-quimioterápico (PQT/OMS). *Hansen. Int.* 2006;31(1):15-21.
27. Gomes CCD, Pontes MAA, Gonçalves HS, Penna GO. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região nordeste do Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 2005;80(Supl 3):283-8.
28. Lima LS, Jadão FRS, Fonseca RNM, Junior GFS, Neto RCB. Caracterização clínica-epidemiológica dos pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Caxias, MA. *Rev. Bras. Clin. Med.* 2009;74-83.
29. Fleury RN, Barreto JA, Bispo MD, Nakandakari S, Martelli ACC. Hanseníase: episódio reacional tuberculóide desencadeado precocemente após instalação de poli-quimioterapia, em indivíduo inicialmente diagnosticado como multibacilar. *Hansen. Int.* 2005;30(2):195-200.
30. Barreto JA, Goya F, Miranda RMC. hanseníase dimorfa reativada: recidiva ou tratamento insuficiente em paciente imunologicamente suscetível? *Hansen. Int.* 2006;31(2):35-8.
31. Lana FCF, Lanza FM, Meléndez GV, Branco AC, Teixeira S, Malaquias LCC. Distribuição da hanseníase segundo sexo no Município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. *Hansen. Int.* 2003;28(2):131-7.
32. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria Conjunta N° 125, de 26 de março de 2009. Define ações de controle da hanseníase. *Diário Oficial. Brasília (DF).* N.º 59, Seção 1 (Mar. 27, 2009).
33. Pedro HSP, Nardi SMT, Ferreira MIP, Goloni MRA, Ferreira EAR, Rossit ARB, Netto AR. Hanseníase: Comparação Entre a Classificação Operacional No Sistema de Informação de Agravos de Notificação e o Resultado da Baciloscopia. *Hansen. Int.* 2009; 34(2):13-9.
34. Conselho Nacional de Saúde. Resolução do Conselho Nacional de Saúde N° 196/96. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm Acesso em 14 mar. 2011.

Correspondência

Augusto César Marques Garcia

Rua Dr. Atualpa Barbosa Lima, 289 Casa Altos B

Praia de Iracema

60060-370 – Fortaleza, CE

E-mail: augustouepb@hotmail.com

Pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes submetidos à aspiração endotraqueal

Ventilator-associated pneumonia in patients undergoing endotracheal suctioning

Gilson Gonçalves dos Santos¹

Bianca Bassani da Silva²

Resumo

A literatura aborda uma incidência elevada de relações de pneumonia associada à ventilação mecânica. De acordo com os dados de vigilância do *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) do Centro de Controle de Doenças (CDC), a pneumonia é a segunda infecção nosocomial em termos gerais e a infecção mais comum em Unidades de Terapia Intensiva-UTI.⁽¹⁾ A etiologia é primordialmente bacteriana, sendo que mais de 90% dos casos são secundários a estes agentes. Os principais agentes causadores de pneumonia associada à ventilação (PAV) são os bacilos Gram negativos, *Pseudomonas aeruginosas*. Devido à sua correlação com o aumento de taxa de mortalidade, a incidência elevada em Unidades de Tratamento Intensivo e a associação a desenvolvimento de microrganismos multirresistentes, torna-se de extrema importância o diagnóstico preciso não só da PAV, como também do agente patogênico, uma vez que ocorre utilização de antibióticos de largo espectro indiscriminadamente, o que pode desencadear uma mutação gênica devido à sua facilidade de troca de informações genéticas.

Palavras-chave

Pneumonia; PAV; Ventilação; *Pseudomonas aeruginosas*

INTRODUÇÃO

A Pneumonia Associada à Ventilação – PAV é uma resposta inflamatória do hospedeiro à multiplicação incontrolada de microrganismos que alcançam as vias áreas distais, decorrente da intubação endotraqueal. Essa multiplicação de microrganismos desencadeia uma depleção dos mecanismos de defesas das vias aéreas superiores (VAS). Existem diversos fatores relacionados à colonização aumentada da orofaringe, entre eles a aspiração endotraqueal, idade avançada e desnutrição, fatores estes que aumentam significativamente o risco da PAV.^(1,2) Enquanto a equipe de enfermagem se preocupa com as formas ideais de tratar seus pacientes na terapia intensiva, farmacêuticos, biomédicos e outros profissionais buscam meios de diagnósticos mais precisos para determinada patologia.⁽³⁾

É conhecido que várias técnicas foram desenvolvidas para amenizar o sofrimento do tratamento em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), como, por exemplo, o sistema fechado de aspiração endotraqueal.⁽³⁾ Neste sistema utiliza-se um cateter de múltiplo uso, que fica conectado entre o tubo endotraqueal e o circuito do ventilador mecânico, eliminando o risco associado com a desconexão do paciente de ventilador mecânico para realizar a sucção.

As principais vantagens deste sistema estão na manutenção dos parâmetros cardiovasculares, proteção da equipe, prontidão para sucção e redução do custo do procedimento e diminuição no risco de infecções.⁽³⁾ Os principais agentes causadores de Pneumonia Associada à Ventilação são *Pseudomonas aeruginosas*, bacilos Gram negativos. A *P. aeruginosa* é uma espécie de bactéria aeróbica, não fermentadora, que se apresenta em forma de bastonetes isolados ou aos pares, movidos por flagelos polares. São patógenos oportunistas, geralmente associados a fatores predisponentes, como ferimentos, infecções parasitárias, otite externa, ou fatores associados à imunodepressão.⁽⁴⁾ *P. aeruginosas* produzem diversas substâncias tóxicas incluindo a Toxina A, Proteases Alcalinas e Elastases, que são importantes na produção do edema, da hemorragia e pneumonias. Ela é uma bactéria invasiva e toxigênica, que cresce facilmente, mesmo em condições desfavoráveis aos outros microrganismos e possuem resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos mais comuns, sendo causa frequente de infecções nosocomiais.

O conhecimento das características da *P. aeruginosa* e de seus mecanismos de patogênese é muito importante para os profissionais de saúde, tanto para o diagnóstico como para a escolha do tratamento.

¹Doutorando em Biologia Funcional e Molecular – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – Campinas, SP, Brasil.

²Graduanda em Farmácia, Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC Campinas) – Campinas, SP, Brasil.

Para o diagnóstico da PAV, os critérios são a presença de progressivo infiltrado pulmonar, febre, leucocitose e secreção traqueobrônquica purulenta. O diagnóstico da infecção é feito pela cultura do material proveniente do processo infeccioso e a intervenção farmacológica é realizada de acordo com o resultado laboratorial do antibiograma.⁽⁵⁾

É importante ressaltar que o uso irrestrito de antibióticos aumenta a resistência à antibioticoterapia. *P. aeruginosa* está entre as bactérias mais amplamente isoladas nos hospitais em todo o mundo, sendo associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes críticos de Unidade Terapia Intensiva, com pneumonia associada à ventilação.⁽⁶⁾ A literatura demonstra que a utilização de antibióticos de largo espectro indiscriminadamente pode desencadear uma mutação gênica que confere perfil de resistência bacteriana.⁽⁷⁾ Portanto, o diagnóstico preciso não só da PAV como também da caracterização do agente patogênico deve ser realizado criteriosamente, uma vez que *P. aeruginosa* possui a facilidade de troca de informações genéticas por meio de genes que codificam enzimas metalo-β-lactamases (MβLs), que são enzimas relacionadas com o perfil de resistência destas bactérias resistentes a beta-lactâmicos. Essa família de enzimas pertence à classificação B, de Ambler, e é muito diversificada, sendo que, no Brasil, a mais encontrada é a Enzima IMP-1, VIM-1 e SPM-1.⁽⁷⁾

O objetivo deste trabalho foi revisar junto à literatura a correlação e necessidade de um diagnóstico correto da pneumonia associada à ventilação mecânica bem como

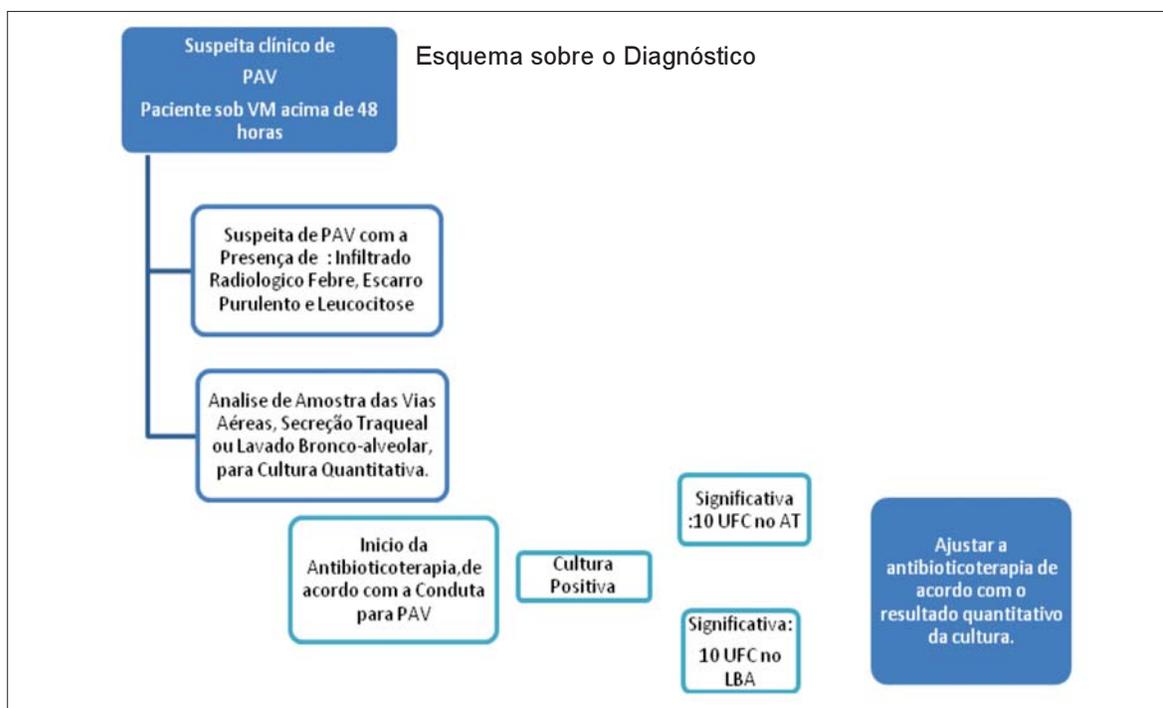
os meios de diagnósticos relacionados a esta patologia, já que a mesma representa um problema de saúde em unidades de saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de atingir os objetivos abordados neste estudo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica construída a partir de materiais já escritos, como livros e artigos científicos da literatura médica das bases de dados Scielo, Medline, Pubmed e Lilacs. A presente pesquisa é do tipo exploratória, que consegue proporcionar maior familiaridade com o problema, com objetivo de torná-lo mais explícito e construir hipóteses acerca do mesmo.

O diagnóstico de PAV é de difícil estabelecimento; desse modo, a determinação do diagnóstico final pode ser facilitada pelo emprego de esquemas (Esquema 1). De acordo com a literatura, o quadro radiológico do tórax que apresentar infiltrado persistente pode estar associado à congestão e causas não infecciosas. Todavia, para caracterizar um processo de infecção, o paciente deve apresentar mudança do aspecto físico do escarro, leucocitose/leucopenia e febre/hipotermia.⁽⁴⁾

Uma vez fechada a suspeita, segue-se a coleta da secreção endotraqueal ou lavado bronco-alveolar e hemocultura. Para se iniciar a antibioticoterapia, emprega-se a Rotina de Conduta de Tratamento da PAV Precoce. Caso o resultado da cultura seja positivo deve-se ajustar a terapia de acordo com o que foi obtido no laboratório.⁽⁴⁾



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pneumonia é uma infecção que ocorre no parênquima pulmonar atingindo bronquíolos respiratórios e alvéolos, que são preenchidos por exudato inflamatório, o que prejudica as trocas gasosas. Ela pode ser causada por qualquer agente infeccioso, como fungos, vírus, parasitas ou bactérias, em sua maioria, e é considerada a principal causa de morte em pacientes hospitalizados.

Os principais agentes causadores desta infecção são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*. Estes se diferenciam de acordo com os pacientes em uma UTI, duração de permanência na mesma e uma precoce terapia antimicrobial.

O diagnóstico de certeza da pneumonia nosocomial associada à ventilação e à escolha do esquema antibioticoterápico correto deveriam ser feitos por meio da identificação etiológica do agente causador, por cultura e antibiograma.⁽⁸⁾

O diagnóstico de *P. aeruginosa* depende do seu isolamento e identificação laboratorial.⁽⁹⁾ Pode ser utilizado o agar-sangue ou meios para o crescimento de bacilos Gram negativos entéricos. A incubação pode ser feita a 42°C, o que inibe o crescimento de outras espécies. Na cultura podem ser observados os seguintes aspectos: (1) Colônias circulares e lisas, com produção de pigmento azul (piocianina) e/ou esverdeado fluorescente (pioverdina); (2) Hemólise (no cultivo em meio agar-sangue); (3) Odor característico. A bactéria cresce bem na maioria dos meios de cultura de rotina, sua identificação baseia-se na sua morfologia (bastonete Gram negativo). As mesmas são produtoras de oxidases e redutores de nitrato a nitrito.

DISPOSIÇÕES FINAIS

Atualmente, nota-se que é de extrema importância o diagnóstico preciso, não apenas da PAV, como também do agente patogênico, uma vez que há utilização de antibióticos de largo espectro indiscriminadamente, o que pode desencadear uma mutação gênica de bactérias como as *P. aeruginosa* devido à sua facilidade de troca de informações genéticas e às mutações e seleções naturais relacionados ao excessivo uso de antibióticos, incluindo os carbapênicos, convertendo-se em ameaças aos pacientes hospitalizados bem como aumentando o tempo de hospitalização e o custo do tratamento.⁽⁴⁾

causative agents of ventilator-associated Pneumonia are Gram-negative Pseudomonas aeruginosa. Given its correlation with increased mortality, the high incidence of Care Units and Intensive association with development of multidrug-resistant bacteria becomes extremely important not only accurate diagnosis of PAV as well of pathogen, as is broad-spectrum antibiotics indiscriminately which can trigger a mutation due to its ease of exchange of genetic information

Keywords

Pneumonia; PAV; Ventilation; Pseudomonas aeruginosa

REFERÊNCIAS

1. George DL. Nosocomial pneumonia. In: Mayhall C G. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. Cap. 12, p. 175-95.
2. Craven DE, Steger K, Duncan RA. Prevention and control of nosocomial pneumonia. In: Wenzel RP. Prevention and control of infection. 2a. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. Cap. 25, p. 580-99.
3. Grossi SAA, Santos BMO. Prevenção da hipoxemia durante a aspiração endotraqueal. Rev. Latino-am. Enfermagem, Ribeirão Preto. 1994 Jan;1994;2(2):87-101.
4. Goldmann DA, Weinstein RA, Wenzel RP, Tablan OC, Duma RJ, Gaynes RP, et al. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. JAMA. 1996 Jan 17;275(3):234-40.
5. Martino MDV. Infecções do trato respiratório inferior. In: Levy CE, et al. Manual de microbiologia clínica aplicada ao controle de infecção hospitalar. São Paulo: APECIH, 1998. p. 3-10.
6. Kollef M. Ventilator-associated pneumonia. JAMA. 1993;270:1965-70.
7. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al. Princípios Básicos da Microbiologia Médica, em: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al. Microbiologia Médica, 4ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004;5-80.
9. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2003.

Correspondência

Gilson Gonçalves dos Santos
E-mail: gilsonbiomed@hotmail.com

Abstract

The literature discusses a high incidence relations of ventilator-associated pneumonia. According to surveillance data from the National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) in CDC2, pneumonia is the second nosocomial infection in general and the most common infection in intensive care units, ICU. The etiology is primarily bacterial and more than 90% of cases are secondary to these agents. The main

Prevalência e perfil de resistência bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes ambulatoriais da Grande Porto Alegre, RS

Bacterial prevalence and resistance profile in urinary tract infections of outpatients from metropolitan region of Porto Alegre, RS

Patrícia Renck Nunes¹

Leila Spagnolo Fonini¹

Marianne Schrader de Oliveira²

Shisue Karina Katagir²

Resumo

As infecções do trato urinário (ITU) têm prevalências distintas de acordo com a faixa etária, gênero do paciente e o local onde foi adquirida a infecção. Do mesmo modo, o perfil de resistência antimicrobiana também apresenta grande variação em relação ao patógeno em questão. O conhecimento do perfil de infecção e resistência de patógenos causadores de ITU pode auxiliar na identificação de fatores predisponentes e na adequação do tratamento dessas infecções. Para a realização do estudo, foram analisadas 3.033 uroculturas de pacientes ambulatoriais atendidos em janeiro e julho de 2011 na Grande Porto Alegre. Foram identificadas 451 uroculturas positivas (86% provenientes de mulheres), sendo que a *Escherichia coli* apresentava-se em 66% dos casos, seguida de *Enterococcus* em 13,5%, *Klebsiella* em 7,5%, *Staphylococcus* em 6,4%, entre outros. Cinquenta e um por cento das cepas de *E. coli* encontradas eram resistentes à ampicilina ou a sulfametoxazol-trimetoprim, enquanto que 10,2% das cepas de *Enterococcus* eram resistentes à norfloxacina. Um dado particularmente preocupante é a alta taxa de resistência de *E. coli* à norfloxacina, antibiótico de primeira escolha no tratamento de ITU. A realização de estudos epidemiológicos recentes, portanto, pode ser essencial na escolha da melhor forma de tratamento.

Palavras-chave

Urocultura; Infecção do trato urinário; Resistência bacteriana; Antibiograma

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) corresponde à terceira doença infecciosa mais comum na prática clínica, ficando atrás somente das infecções do trato respiratório.⁽¹⁾ As infecções do trato urinário são multiplicações anormais de microrganismos (vírus, fungos ou bactérias patogênicas) nos rins, ureteres, bexiga e/ou uretra. Em condições normais, o trato urinário é estéril acima da uretra.⁽²⁾

As ITU podem ocorrer por via linfática, uma vez que o rim possui conexão linfática com o intestino, por via hematogênica, visto que o rim possui intensa vascularização e está, portanto, suscetível em infecções sistêmicas, e por via ascendente, quando o microrganismo atinge o trato urinário através da uretra, podendo chegar à bexiga, ureteres e rins. Esta última é a via de infecção mais comum em pacientes ambulatoriais, sendo as mulheres as mais atingidas.

Estima-se que entre 10% e 20% das mulheres terão, pelo menos, um episódio de ITU no decorrer da vida e que 25% a 30% apresentarão recidivas.⁽³⁾ No homem, o com-

primário da uretra, o maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são fatores protetores contra ITU. Por outro lado, a hiperplasia prostática, observada com o avanço da idade, pode obstruir parcialmente o fluxo urinário e impedir o completo esvaziamento vesical, podendo causar, conseqüentemente, infecções no trato urinário.^(4,5)

As ITU podem ser sintomáticas ou assintomáticas. Os sintomas pelos quais pacientes ambulatoriais buscam orientação médica são disúria, urgência miccional, polaciúria, febre, calafrios, dor suprapúbica, entre outros.⁽⁶⁾ O padrão-ouro para o diagnóstico de ITU é a urocultura, seguida de identificação do agente etiológico e da determinação de seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos por antibiograma ou teste de sensibilidade a antimicrobianos.⁽³⁾ Os resultados desses exames, entretanto, podem levar mais de uma semana para serem liberados, motivo pelo qual a automedicação é tão praticada entre pacientes ambulatoriais. A automedicação é muitas vezes acompanhada de um tratamento insuficiente em termos de tempo de administração da droga, uma vez que o paciente tende a parar o tratamento no momento em que cessarem os sintomas.

¹Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICBS-UFRGS – Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório Endocrinometria de Análises Clínicas, RS, Brasil.

Somado a isso, a prescrição empírica de medicamentos pode levar a um tratamento ineficiente no qual o antibiótico trará somente prejuízos ao organismo.^(7,8)

Outro sério problema da automedicação é o aumento da resistência bacteriana quando o tratamento é mal conduzido. Isso é de extrema importância visto que uma parcela dos pacientes terá reincidência de ITU, o que pode tornar seu tratamento subsequente mais complicado. Diversos estudos mostram que alguns antibióticos, principalmente a ampicilina, que já foram largamente utilizados, agora já não se apresentam mais como antibióticos de primeira escolha justamente pela alta porcentagem de patógenos a eles resistentes.^(1,9)

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a região metropolitana de Porto Alegre, ou Grande Porto Alegre, possui mais de 3 milhões e 900 mil habitantes.⁽¹⁰⁾ Considerando-se os dados do IBGE e da Anvisa, estima-se que a prevalência de ITU ultrapasse 40 mil pessoas na região.^(3,10)

O tratamento inicial é usualmente empírico e guiado por dados disponíveis na literatura. Diversos estudos indicam a redução progressiva da taxa de sensibilidade aos antimicrobianos, restringindo as opções terapêuticas para uso empírico.^(9,11-14) O conhecimento do perfil dos agentes etiológicos mais frequentes permite adequar a estratégia de tratamento à suscetibilidade dos patógenos encontrados na população local.

Frente a este quadro, verifica-se que poucos estudos têm analisado o perfil de resistência aos antimicrobianos causadores de ITU adquiridas na comunidade. Estudos de vigilância internacional da resistência demonstram um aumento no padrão de resistência contra antimicrobianos comumente utilizados no tratamento destas infecções.^(15,16) Programas de vigilância podem ser ferramentas valiosas disponibilizando informações importantes referentes à resistência bacteriana ou localização geográfica e tipo de infecção referente à determinada população.⁽¹⁷⁾ Estudos regionais que analisem as ITU adquiridas na comunidade e seu padrão de resistência aos antimicrobianos são necessários visando à diminuição da resistência frente aos antibióticos comumente utilizados na prática clínica, otimizando o tratamento destas infecções e a qualidade de vida dos pacientes.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de infecções do trato urinário e de resistência a antibióticos de pacientes ambulatoriais na região da Grande Porto Alegre, RS, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo por análise retrospectiva em 3.033 uroculturas de pacientes ambulatoriais da região metropolitana de Porto Alegre (municípios de Porto Alegre,

Canoas, Novo Hamburgo, Cachoeirinha, Santo Antônio da Patrulha e Gravataí) atendidos no Laboratório Endocrimeta de Análises Clínicas Ltda. Foram coletados dados dos meses de janeiro e julho de 2011.

As amostras de urina (1 µL) foram semeadas em agar cromogênico (PROBAC) com alça estéril descartável e deixadas em estufa a 36°C ± 1°C por 18 horas a 24 horas. Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram crescimento igual ou superior a 100.000 UFC/mL ao final desse período. A identificação exata das colônias foi realizada por meio de testes bioquímicos complementares e/ou de coloração de Gram.^(18,19)

Após a identificação, os testes de sensibilidade microbiana foram conduzidos em meio Müeller-Hinton. Brevemente, a colônia foi diluída em salina estéril até que essa atingisse a turbidez de 0,5 na escala McFarland e essa solução foi semeada com haste flexível descartável e estéril no meio de cultura. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de Kirby-Bauer por disco-difusão. O halo de inibição do crescimento bacteriano foi avaliado após 18 horas a 24 horas de incubação da placa em estufa (36°C ± 1°C) e foram seguidos os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.⁽²⁰⁾

Os resultados utilizados neste estudo foram coletados a partir de registro em bancos de dados do laboratório. As variáveis quantitativas estão representadas por meio de construção de gráficos contendo frequências relativas (%).

RESULTADOS

Das 3.033 uroculturas, 451 (14,9%) foram consideradas positivas, observando-se maior prevalência em mulheres (86,9%) que em homens (13,1%). Não foram observadas tendências à sazonalidade. As faixas etárias com maior número de amostras positivas foram aquelas entre 21 e 30 anos e a partir de 71 anos (Tabela 1).

Tabela 1. Gênero e faixa etária dos indivíduos atingidos pelas ITU na região da Grande Porto Alegre

	Total	Positivas
Uroculturas	3033	451
Gênero	Total	% dos Positivos
Feminino	392	86,9%
Masculino	59	13,1%
Faixa Etária	Total	% dos Positivos
0 a 10 anos	26	6%
11 a 20 anos	30	7%
21 a 30 anos	86	19%
31 a 40 anos	59	13%
41 a 50 anos	47	10%
51 a 60 anos	70	16%
61 anos ou mais	133	29%

O micro-organismo mais frequentemente isolado foi a *Escherichia coli*, que correspondeu a 66,3% das infecções, seguido de *Enterococcus* sp. (13,5%), *Klebsiella pneumoniae* (7,5%), *Staphylococcus saprophyticus* (6,4%), *Proteus mirabilis* (5,5%), *Staphylococcus aureus* (2,4%) e *Pseudomonas aeruginosa* (0,7%). Os outros 1,1% foram compostos por outros micro-organismos, como *Citrobacter* sp. (Figura 1).

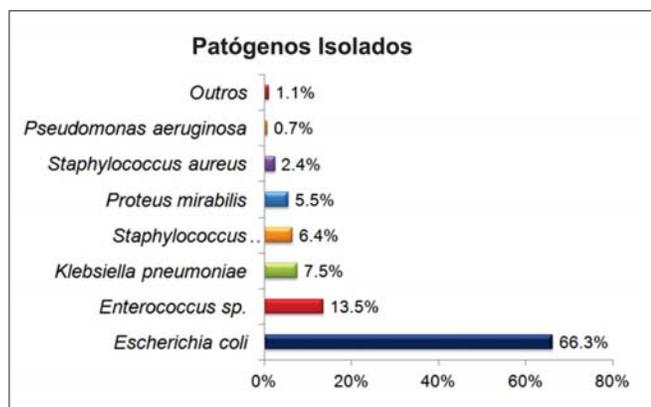


Figura 1. Patógenos isolados em uroculturas positivas de pacientes ambulatoriais na região da Grande Porto Alegre.

Entre as cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), somente 29,1% apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados. Das cepas resistentes, 44,5% apresentaram resistência à ampicilina, enquanto que 36,1% eram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim; 51,1% apresentaram resistência a ambos os quimioterápicos. Outros antibióticos aos quais as cepas apresentaram resistência foram: norfloxacina (30,6%), cefalotina (16,5%), gentamicina (12,4%), ceftazidima (4,1%), nitrofurantoína (4,1%), ceftriaxona (2,4%) e ciprofloxacina (2,4%) (Figura 2).

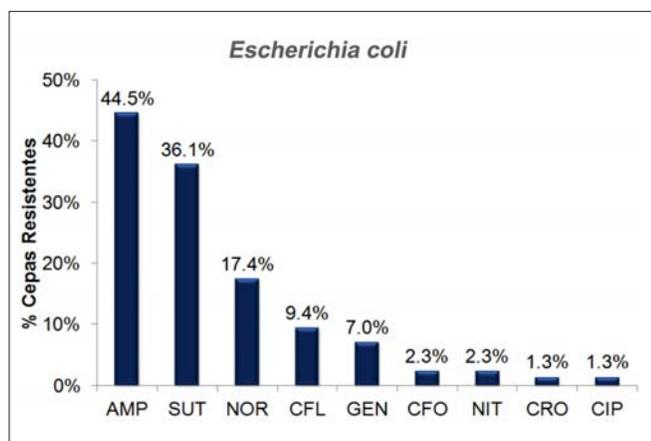


Figura 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado por cepas de *E. coli* isoladas de pacientes ambulatoriais. AMP - ampicilina; SUT - sulfametoxazol-trimetoprim; NOR - norfloxacina; CFL - cefalotina; GEN - gentamicina; CFO - ceftazidima; NIT - nitrofurantoína; CRO - ceftriaxona; CIP - ciprofloxacina.

A segunda bactéria mais prevalente nas amostras de urina analisadas foi *Enterococcus* sp. Diferentemente ao perfil de sensibilidade apresentado pelas cepas de *E. coli*, grande parte das cepas de *E. faecalis* apresentaram sensibilidade aos antibióticos testados. Somente 10,2% demonstraram resistência à norfloxacina, 6,1%, à ampicilina, 4,1%, à nitrofurantoína, 4,1% (Figura 3).

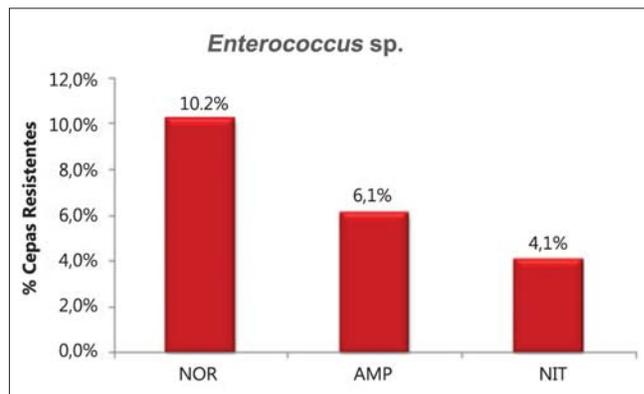


Figura 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado por cepas de *Enterococcus* isoladas de pacientes ambulatoriais. NOR - norfloxacina; AMP - ampicilina; NIT - nitrofurantoína.

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram resistência natural à ampicilina, porém 15% também são resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim e 12% à nitrofurantoína (Figura 4).

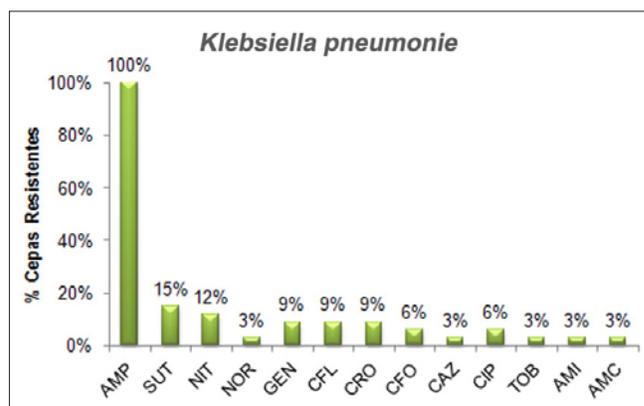


Figura 4. Perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado por cepas de *Klebsiella* isoladas de pacientes ambulatoriais. AMP - ampicilina; SUT - sulfametoxazol-trimetoprim; NIT - nitrofurantoína; NOR - norfloxacina; GEN - gentamicina; CFL - cefalotina; CRO - ceftriaxona; CFO - ceftazidima; CAZ - Ceftazidima; CIP - ciprofloxacina; TOB - Tobramicina; AMI - amicacina; AMC - Amoxicilina com Ácido clavulânico.

Conforme esperado, todas as cepas de *Proteus mirabilis* apresentaram resistência à nitrofurantoína, porém 24% delas eram resistentes à ampicilina e 24% também a sulfametoxazol-trimetoprim (Figura 5), sendo que, em alguns casos, essa resistência era concomitante.

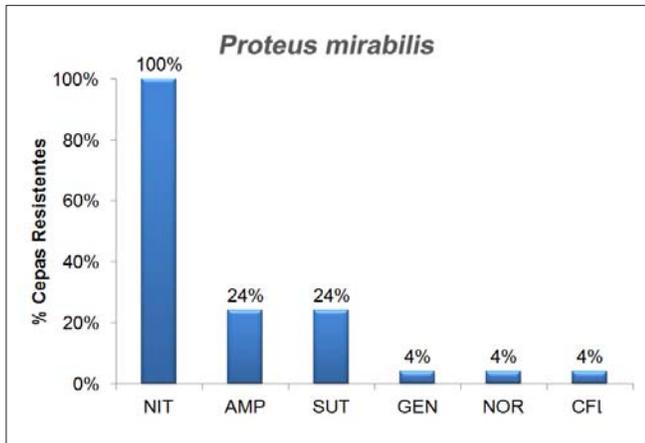


Figura 5. Perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado por cepas de *Proteus* isoladas de pacientes ambulatoriais. AMP - ampicilina; SUT - sulfametoxazol-trimetoprim; GEN - gentamicina; NOR - norfloxacina; CFL - cefalotina. Todas as cepas são resistentes a NIT - nitrofurantoína.

DISCUSSÃO

No Brasil, a ITU é uma das infecções bacterianas mais comuns e responsáveis por significativa mortalidade.⁽²¹⁾ Enquanto o tratamento preciso e eficaz das ITU pode evitar complicações graves, como pielonefrites, abscessos renais e piodrose,⁽²²⁾ o conhecimento da prevalência e do perfil de resistência antimicrobiana pode auxiliar a comunidade médica na escolha do melhor tratamento dessas infecções.

Na população analisada, quase 87% dos indivíduos atingidos por ITU eram mulheres. Este achado corrobora com os dados obtidos na literatura em que incidência de infecção urinária em homens é muito menor do que nas mulheres. Indivíduos do sexo feminino apresentam maior suscetibilidade a esse tipo de infecção devido a questões fisiológicas, como o menor fluxo urinário, e anatômicas, como o menor comprimento da uretra.⁽³⁾

Quanto à faixa etária dos pacientes atingidos, 19% apresentavam idade entre 21 e 30 anos. Esta faixa etária possui maior atividade sexual, sendo identificada como um fator de risco para a aquisição de ITU.⁽²¹⁾ Outra faixa etária muito atingida são indivíduos com idade superior a 71 anos (23%). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções, em geral, constituem a maior causa de morte em idosos.⁽²³⁾ A OMS destaca ainda a crescente resistência bacteriana em idosos, provavelmente devido ao uso de antibióticos ao longo da vida. Nessa população, as ITU são mais comuns pela presença de fatores como o enfraquecimento dos músculos do assoalho pélvico e a hiperplasia prostática, que dificultam o esvaziamento total da bexiga e favorecem a estase e adesão bacteriana, a redução da capacidade vesical, quedas nos níveis hormonais que levam à redução das secreções vaginais e a alterações no epitélio, diminuição da atividade bactericida da secreção prostática, entre outros.⁽²⁴⁾

Tanto em pacientes ambulatoriais quanto em hospitalares, a *Escherichia coli* é o agente etiológico mais prevalente em ITU, sendo isolado em 60% a 90% dos casos.^(9,13,25,26) No presente estudo, cerca de 66% das uroculturas positivas apresentaram *E. coli*. É importante ressaltar que mais da metade das cepas de *E. coli* encontradas eram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim e/ou à ampicilina, antibióticos que já se encontram no mercado há anos, mas que são de classes distintas (sulfonamida e beta-lactâmico, respectivamente). Preocupantemente, ao longo dos últimos anos vem sendo observado um aumento da resistência de cepas de *E. coli* a uma terceira classe de antimicrobianos, as quinolonas. Dezesete por cento das cepas analisadas apresentaram resistência à norfloxacina, um quimioterápico da classe das quinolonas que inibe a topoisomerase II e IV, sendo considerado de amplo espectro. Atualmente, a norfloxacina é um dos antibióticos mais utilizados para tratamento das ITU, mas este estudo demonstra que, em grande parte das cepas testadas, o antibiótico já se mostra ineficaz. Este achado indica que seu uso indiscriminado já está levando à seleção de microrganismos resistentes, dificultando o tratamento das ITU. Por outro lado, a ciprofloxacina, fluoroquinolona alternativa à norfloxacina com maior penetração intracelular, ainda mostrou-se eficiente em cerca de 98% dos casos de infecção por *E. coli*, apresentando-se como uma opção nos casos de *E. coli* resistentes aos antibióticos de primeira escolha e em infecções recorrentes.

Da mesma forma, foi encontrado um perfil elevado de resistência (10,2%) à norfloxacina no segundo agente patológico mais prevalente, o *Enterococcus* sp., nas amostras de urocultura analisadas. Quando comparado à *E. coli*, este patógeno apresenta menos resistência geral, incluindo somente 6,1% de resistência à ampicilina. Enquanto isso, parte considerável das cepas de *Klebsiella* apresentam-se resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim e à nitrofurantoína. Nesses casos, ao contrário das infecções por *E. coli*, a norfloxacina apresenta-se como uma das melhores opções de quimioterapia, o que ressalta a importância do diagnóstico clínico-laboratorial anterior ao tratamento.

O presente estudo também apresenta o perfil de sensibilidade a cefalosporinas, sendo importante ressaltar que 9% das cepas de *Klebsiella* são resistentes à ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração. Enquanto isso, na população da região da Grande São Paulo, menos de 2% das cepas de *Klebsiella* eram resistentes à ceftriaxona em 2007.⁽²⁷⁾ Essa discrepância demonstra a importância da regionalização dos estudos e a dificuldade na generalização de achados de pesquisas e planos de tratamento no território nacional. Mesmo em populações muito próximas geograficamente, o perfil de infecção e resistência microbiana pode variar consideravelmente. Um estudo

semelhante e recente também realizado no Rio Grande do Sul mostrou resultados significativamente diferentes dos presentes, encontrando somente 1% de *Enterococcus* sp. nas amostras de urina,⁽¹⁴⁾ fato que ressalta mais uma vez a importância dos estudos epidemiológicos.

O perfil de resistência microbiana encontrado nas uroculturas analisadas de pacientes da região da Grande Porto Alegre poderia ser justificado pelo uso inadequado ou indiscriminado de antibióticos, o que leva à seleção de cepas com mecanismos de resistência. Estudos epidemiológicos dos uropatógenos e o estabelecimento do perfil da sensibilidade aos antimicrobianos são aspectos de relevância, pois podem ser significativamente diferentes por estarem associados a pressões seletivas locais.⁽¹¹⁾ Assim, este estudo pretende contribuir com busca da qualidade do tratamento das ITU enfatizando a importância do diagnóstico preciso e dos testes de antibiograma prévios à administração de antibióticos em ITU. A escolha do medicamento deve ser feita com base no resultado do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, já que o perfil de resistência é variável e muitos micro-organismos isolados de pacientes com suspeita de ITU apresentaram resistência a antibióticos utilizados empiricamente. Também é demonstrado que a resistência aos três antibióticos mais comumente utilizados na prática clínica – ampicilina, norfloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim – está atingindo níveis preocupantes, o que reforça ainda mais a necessidade de antibiogramas prévios à prescrição de antibióticos.

CONCLUSÃO

Estudos epidemiológicos como este auxiliam na escolha e na otimização do uso racional dos antimicrobianos possibilitando maior qualidade ao tratamento de infecções urinárias. Também demonstram a importância da realização de ensaios de análise do perfil de resistência do patógeno, prévio ao tratamento antimicrobiano.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Endocrineta, que contribuiu para a realização deste estudo.

Abstract

The urinary tract infections (UTI) have different prevalence according to age, gender of the patient and where infection was acquired. Similarly, the profile of antimicrobial resistance also varies widely in relation to the pathogen in study. Knowledge of infection and resistance profile of pathogens causing UTI may help identify predisposing factors and the adequacy of treatment of these infections. For this study, we analyzed 3,033 urine cultures from outpatients seen in January and July 2011 in Grande Porto Alegre. We identified 451 positive urine cultures (86% from women), and Escherichia coli was identified in 66% of the cases, followed by Enterococcus in 13.5%, 7.5% Klebsiella, Staphylococcus 6.4%, and others. Fifty-one percent E. coli strains were resistant to ampicillin or to trimethoprim-sulfamethoxazole, and 10.2% of

Enterococcus strains were resistant to norfloxacin. A particularly concerning data is the high rate of resistance of E. coli to norfloxacin, the antibiotic of first choice in UTI. Recent epidemiological studies, thus, may be essential in choosing the best treatment.

Keywords

Urine culture; Urinary tract infection; Bacterial resistance; Antibiotic

REFERÊNCIAS

- Bail L, Ito CAS, Esmerino LA. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. Rev. Bras. Anál. Clín. 2006;38(1):51-6.
- Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por meios laboratoriais. 21ª ed, São Paulo: Manole, 2013.
- Levy CE. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde: Principais Síndromes Infeciosas. 1ª ed. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 65 p.
- Ide E, Santos SP, Grillo JM, Prado NG. Síndrome uretral, infecções urinárias recorrentes e uretrotomia interna. J. bras. urol. 1980; 6(2):142-5.
- Matsumoto T. Urinary tract infections in the elderly. Curr Urol Rep. 2001 Aug;2(4):330-3.
- Schmiemann G1, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. Dtsch Arztebl Int. 2010 May;107(21):361-7.
- Loureiro CCS, Adde CA, Perez FEG, Penha SS. Efeitos adversos de medicamentos tópicos e sistêmicos na mucosa bucal. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2004;70(1):106-11.
- Louro E, Romano-Lieber NS, Ribeiro E. Eventos adversos a antibióticos em pacientes internados em um hospital universitário. Rev. Saúde Pública. 2007;41(6):1042-48.
- Silveira SA. Prevalência e Suscetibilidade Bacteriana em Infecções do Trato Urinário de Pacientes Atendidos no Hospital Universitário de Uberaba. Rev. Bras. Anál. Clín. 2010;42(3):157-60.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Página visitada em 02 nov. 2015.
- Costa LC, Belem LF, Silva PMF, Pereira HS, Silva Jr ED, Leite TR, Pereira GJ. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. Rev. Bras. Anál. Clín. 2010;42 (3):175-80.
- Damasceno DD, Terra FS, Libanio SIC. Perfil da incidência bacteriana e resistência antimicrobiana em uma instituição hospitalar. Rev. Min. Enferm. 2008;12(1):104-9.
- Menezes KMP, Góis MAG, Oliveira ID, Pinheiro MS, Brito AMG.. Avaliação da resistência da Escherichia coli frente a Ciprofloxacina em uroculturas de três laboratórios clínicos de Aracaju-SE. Rev. Bras. Anál. Clín. 2009;41(3):239-42.
- Santos RCV, Klein DR, Duarte M. Prevalência e perfil de resistência de microorganismos em infecções do trato urinário diagnosticados em pacientes ambulatoriais em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Anál. Clín. 2009;41(4):311-4. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/rbac.aspx>
- Bukharie HA, Saeed IM. Antimicrobial Resistance Among Pathogens Causing Acute Uncomplicated UTIs. Infect. Med. 2001;18:358-62.
- Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. Ann Intern Med. 2001 Jul 3;135(1):41-50.
- Masterton RG. Surveillance studies: how can they help the management of infection? J Antimicrob Chemother. 2000 Sep;46 Suppl T2:53-8.
- Koneman EW, Allen SD, Janda, WM. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª. ed. Rio de Janeiro, Medsi, 2008. 1465 p.
- MacFaddin JF. Biochemical tests for identifications of medical bacteria. 3ª ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.

20. Clinical And Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15ª Informação Suplementar, Documento M100-S25. Pensilvânia, EUA, 2015.
21. Pompeo ACL, Pompeo AMSF, Rocha LCA, Carrerette FB, Araújo JFC, Carneiro KS. Infecção do Trato Urinário no Idoso. Projeto Diretrizes. Sociedade Bras. de Urol. 2004.
22. Bruschini H, Carneiro KS, Carrerete FB, Araújo JFC, Pompeo ACL. Infecção do Trato Urinário Complicada. Projeto Diretrizes. 2004. 7 p.
23. World Health Organization. The world health report 1995: bridging the gaps. Genebra, WHO, 1995.
24. Vieira Neto OM. Infecção do Trato Urinário. Medicina. 2003;36(2/4):365-9.
25. Arruda R. A Frequência e a susceptibilidade de bactérias que causam infecções do trato urinário no Hospital da Criança Uberaba - Minas Gerais. AC&T Cient. 2009;4(1).
26. Kazmirczak A, Giovelli FH, Goulart LS. Caracterização das Infecções do Trato Urinário Diagnosticadas no Município de Guarani das Missões - RS. Rev. Bras. Anál. Clín. 2005;37(4):205-7.
27. Kiffer C, Mendes C, Oplustil C, Sampaio JL. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from a major urban city. Int Braz J Urol. 2007 Jan-Feb;33(1):42-8.

Correspondência

Patricia Renck Nunes

Rua Dom Pedro I, 935 – Rio Branco

93040-610 – São Leopoldo, RS

E-mail: pat__@hotmail.com

Cultura de vigilância de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) em pacientes de unidades de terapia intensiva de um hospital terciário do norte do Rio Grande do Sul, Brasil

Culture surveillance enterobacteria resistant to carbapenems (ERC) in patients in intensive care unit of a tertiary hospital in northern Rio Grande do Sul, Brazil

Carla Rosane Fiorentin
Daiane Bopp Fuentes

Resumo

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) representa um importante mecanismo de resistência no ambiente hospitalar mundial, estando envolvida em casos mais graves, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), por ser uma bactéria oportunista. A pesquisa de KPC é relevante a fim de alertar sobre a disseminação da resistência aos antimicrobianos, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas. A KPC é uma enzima produzida por bactérias Gram negativas da família das enterobactérias e sua presença pode conferir resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Este estudo pesquisou 136 isolados clínicos de pacientes internados em UTIs de um hospital terciário do norte do Rio Grande do Sul, realizando o teste de disco-difusão com imipenem e meropenem, utilizando, como controle positivo, uma cepa de *Acinetobacter baumannii* produtora de Verona Imipenemase (VIM) e, como controle negativo, *Escherichia coli* ATCC 25922. Das 136 culturas analisadas no período de um mês, não foram encontradas culturas positivas para enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), o que indica a inexistência de colonização por KPC nas culturas de pacientes nas UTIs estudadas, o que não exclui a importância e a necessidade de continuidade das coletas de vigilância epidemiológica.

Palavras-chave

Klebsiella pneumoniae carbapenemase; Resistência bacteriana a antimicrobianos; Infecção hospitalar

INTRODUÇÃO

No ambiente hospitalar, os pacientes colonizados por linhagens de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC) – bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* – devem ser identificados e isolados dos demais pacientes para evitar a disseminação da resistência e a ocorrência de um surto hospitalar. A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias pode ser causada pela enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), entre outras β -lactamases, a qual apresenta alto índice de transmissão nosocomial, por estar localizada em um plasmídeo transferível.

A situação preocupa porque a presença da enzima KPC em isolado bacteriano confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar peni-

linas, cefalosporinas e monobactâmicos, causando infecções graves em diferentes partes do corpo humano, estando associada a altos índices de mortalidade. Ao mesmo tempo, o patógeno encontra terreno fértil para a proliferação nos hospitais por faltas de medidas básicas de prevenção entre profissionais da saúde, pacientes e familiares e/ou visitantes, propagando-se pelo contato intra-hospitalar.⁽¹⁾

A β -lactamase KPC ocorre mais comumente em *Klebsiella pneumoniae*, mas também foi relatada esporadicamente em outras espécies de enterobactérias (*Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* e *Serratia* spp.) e *Pseudomonas aeruginosa*.⁽²⁾ De acordo com a Anvisa (2010), a KPC foi identificada inicialmente em *Klebsiella pneumoniae* pela primeira vez em 2001, na Carolina do

¹Aluna do Instituto de Ciências Biológicas, curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Professora do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Norte, EUA. Após a rápida expansão da classe de carbapenemase KPC na costa leste dos Estados Unidos, os relatos em todo o mundo começaram a aparecer. Microrganismos produtores de KPC continuaram a se espalhar ao longo do tempo e já foram reportados em 27 estados dos Estados Unidos e em muitos países do mundo, incluindo China, Colômbia, Brasil, Israel, Canadá, França, Irlanda, Grécia e mais recentemente na Itália.⁽³⁾

Entre setembro e novembro de 2006, quatro cepas *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos foram isoladas de quatro pacientes internados em diferentes Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de um hospital terciário localizado em Recife, no nordeste do Brasil.⁽⁴⁾ Segundo a Anvisa, entre 2009 e 2010 já foram relatados casos nos hospitais do Espírito Santo (3); Goiás (4); Minas Gerais (12); Santa Catarina (3); Distrito Federal (157) e São Paulo (70).⁽⁵⁾

A triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas de terceira geração (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona) e imipenem (IPM), meropenem (MEM) e ertapenem (ETP), além do teste de Hodge modificado,⁽¹⁾ embora, para fins de diagnóstico, somente a medida do diâmetro dos halos de inibição para carbapenêmicos seja suficiente para detecção de carbapenemase.

Neste estudo avaliou-se a ocorrência da colonização do trato gastrointestinal por ERC em pacientes internados em UTIs de um hospital terciário do noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Considerando as confirmações recentes de infecções causadas por bactérias produtoras de KPC em diferentes localidades do Brasil, tornou-se importante sua pesquisa, pois após sua identificação pode-se controlar e reduzir a sua disseminação. O serviço de identificação de pacientes colonizados por essas bactérias ainda não existia neste hospital, tornando-se importante essa proposta para todos os pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva e que fazem uso de antimicrobianos de amplo espectro.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi realizado no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O hospital dispõe de serviços em diversas áreas como: medicina de alta complexidade, internação hospitalar, serviços ambulatoriais, medicina nuclear, centro diagnóstico, centro cardioneurovascular, centro oncológico, emergência, Banco de Tecidos Músculo-Esqueléticos, transplantes e engenharia biomédica, com abrangência macrorregional, atendendo a mais de 350 municípios. O hospital possui 600 leitos de internação, sendo que 78 correspondem a Unidades de Terapia Intensiva adulto, pediátrico e neonatal.

Tipo de estudo e coleta de dados

O delineamento desta pesquisa consiste num estudo transversal quantitativo, com amostra induzida conforme a demanda dos serviços envolvidos, que inclui pacientes das UTIs do HSVP e culturas bacterianas coletadas nos meses de abril e maio de 2011. As amostras de swab retal foram coletadas no primeiro dia da internação de cada paciente na UTI, 7, 14 e 21 dias após, com o propósito de observar a evolução da colonização por ERC. Os dados coletados foram dispostos em uma planilha, contendo as seguintes informações: nome, idade, sexo, unidade de internação, tempo de internação, data da coleta, número do registro do paciente no laboratório e resultado da cultura de vigilância epidemiológica para ERC, observando se o paciente chegou à instituição colonizado. Esta coleta de dados foi realizada por meio do sistema interno de computadores do HSVP no Laboratório de Análises Clínicas.

As coletas foram realizadas pela equipe de enfermagem das UTIs, sendo que a mesma recebeu orientações prévias para o procedimento de coleta, com o objetivo de minimizar erros e auxiliar as interpretações microbiológicas. Os isolados bacterianos de um mesmo paciente foram identificados por numeração arábica, e os tipos morfológicos diferentes no mesmo paciente por letras (exemplo: 1a, 1b, 1c, e, de outro paciente: 2a, 2b, 2c, ...). Por razões éticas, o nome dos pacientes foi utilizado apenas pelos pesquisadores e foi mantido em absoluto sigilo, sendo que a participação na pesquisa não ofereceu risco à saúde do mesmo.

Metodologia

O processamento das amostras seguiu a metodologia descrita na Nota Técnica Nº 01/2010 de culturas de vigilância para detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemases (ERC).⁽⁶⁾ Para isso, utilizaram-se amostras de swab retal acondicionadas no meio de transporte Amies.

Em um tubo contendo 5 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB), adicionou-se um disco meropenem (10 µg) e introduziu-se o swab, homogeneizando a amostra no caldo. Esta cultura foi incubada em estufa bacteriológica, por 16-18 horas a 35±2°C.

Após esse período de incubação, a cultura foi homogeneizada e repicada, por esgotamento, em uma placa contendo agar MacConkey, aplicando sobre a superfície do agar um disco de imipenem (10 µg) e outro de meropenem (10 µg). Incubou-se novamente a placa em estufa bacteriológica por 16-18 horas a 35±2°C.

O controle de qualidade foi feito a cada bateria de testes realizados, utilizando-se como controle positivo cepas de *Acinetobacter baumannii* produtora de Verona Imipenemase (VIM) (Figura 1), e controle negativo *Escherichia coli* ATCC 25992.



Figura 1. Controle positivo: *Acinetobacter baumannii* produtora de VIM. Foto cedida pela Dra. Ana Cristina Gales, do Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo.

A cultura foi reportada como positiva ou negativa para enterobactéria resistente a carbapenêmicos possível produtora de KPC, VIM dentre outras (Figura 2).



Figura 2. Resultado negativo: cultura de vigilância epidemiológica de paciente em estudo.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedeceram aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sob protocolo no 049/2011. Nenhum dos procedimentos usados ofereceu riscos à dignidade dos participantes.

Biossegurança e descarte de material biológico

As atividades seguiram as recomendações de biossegurança quanto a manuseio e descarte de material biológico, bem com a utilização de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) e EPCs (Equipamentos de Proteção Coletiva) aplicados a laboratórios de microbiologia.⁽⁷⁾ Os procedimentos laboratoriais microbiológicos, desde a coleta do material até a emissão do laudo, seguiram as orientações do Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de material biológico foram conduzidos dentro das normas da Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS).⁽⁸⁾

Após as análises, as amostras foram eliminadas com subsequente descarte segundo resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004, da Anvisa.⁽⁹⁾

RESULTADOS

Ao todo, 136 culturas de um total de 106 pacientes foram analisadas no período de 18 de abril a 18 de maio de 2011. Dentre elas, 95 na UTI- Central, 9 no CCIE (Centro de Cuidados Intensivos de Enfermagem), 22 na UTI-Pediátrica e 10 UTI-Neonatal. Neste período de estudo, não foram encontradas culturas positivas para ERC. A existência de colônia fermentadora de lactose próxima ao disco seria identificada bioquimicamente e testada por disco-difusão conforme os critérios da Nota Técnica N° 01/2010.

As coletas para a realização das culturas foram feitas no primeiro, no sétimo, no décimo quarto e no vigésimo primeiro dia de internação. Sendo assim, 76 pacientes (71,7%) foram analisados no primeiro dia de internação, 24 pacientes (22,6%) no sétimo dia, cinco pacientes (4,7%) no décimo quarto e um paciente (0,9%) no vigésimo primeiro dia de internação. Pacientes que receberam alta da UTI ou sofreram óbito ou não foram acompanhados posteriormente. Todas as 136 culturas de swab retal avaliadas apresentaram resultado negativo pela pesquisa fenotípica para a presença de ERC.

DISCUSSÃO

A pesquisa fenotípica de ERC nas 136 amostras incluídas neste estudo revelou resultado negativo para todas as cepas testadas, eliminando a possibilidade da presença fenotípica de carbapenemase provavelmente KPC. Porém, o número de amostras testadas pode não ter sido satisfatório para a detecção desse mecanismo de resistência emergente, visto que, até o momento, se conhecem raros relatos de KPC no Brasil oficialmente descritos,⁽⁴⁾ e pela duração do estudo, que não é representativa do ano de 2011. Em contrapartida, nos Estados Unidos, a enzima já se tornou endêmica.^(10,11) Em pesquisa realizada por Bratu et al., em dois hospitais de Nova York, foram testadas 602 amostras e 45% apresentaram algum mecanismo de resistência, sendo apenas 3,3% (44) confirmadas por biologia molecular como KPC-2. De modo semelhante, em Israel, entre 2004 e 2006, foram estudadas 4.149 cepas resistentes a carbapenêmicos e, delas, apenas 51 (1,3%) foram identificadas como KPC positiva. Evolutivamente, em 2004-2005, a enzima foi encontrada em somente seis isolados, e as demais (45), em 2006, denotando crescente aumento da KPC. A proporção anual desse mecanismo de resistência foi de 0,4%, 0,7% e 3,1% nos três anos de estudo, respectivamente.⁽¹²⁾

A partir de 2009, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) passou a recomendar a pesquisa da enzima KPC em isolados de enterobactérias com resistência a cefalosporinas de terceira geração (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima e ceftriaxona) e sensibilidade diminuída a carbapenêmicos (ETP 19-21 mm; MER 16-21 mm; IMP: é fraco preditor de carbapenemase). Nessa situação, a padronização estabeleceu a confirmação de carbapenemase por meio do teste de Hodge modificado.⁽¹³⁾ Entretanto, de acordo com o manual M100-S19 (CLSI, 2011), a realização do teste de Hodge modificado não é mais obrigatória na rotina do laboratório de microbiologia, sendo necessária apenas para fins epidemiológicos.

O serviço de identificação de pacientes colonizados por esses patógenos multirresistentes não existia neste hospital, o que tornou importante essa proposta de estudo para todos os pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva e que fazem uso de antimicrobianos de amplo espectro. Sugere-se que o período de amostragem seja ampliado por, no mínimo, 12 meses para promover a vigilância eficaz destas cepas. Como as enzimas KPC estão localizadas em estruturas genéticas móveis que podem se disseminar entre os pacientes e levar a surtos epidêmicos no ambiente hospitalar, faz-se importante a investigação desse patógeno em testes laboratoriais de rotina. Assim, fica sinalizada a importância de se estabelecer uma rotina para a pesquisa de KPC em isolados de *Enterobacteriaceae* com sensibilidade reduzida a carbapenêmicos, posto que esses pacientes possuem o maior potencial de apresentar essa nova carbapenemase.

Além disso, um controle rigoroso da infecção é absolutamente necessário, pois esses microrganismos são de fácil transferência. A higiene das mãos é fundamental para evitar a propagação de bactérias, inclusive as produtoras de KPC. Comissões e Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH e SCIH) são decisivos no controle do uso de antimicrobianos e de procedimentos de higienização/esterilização em ambientes hospitalares, e, ainda, devem monitorar o perfil de sensibilidade das bactérias isoladas na instituição e promover a educação dos profissionais da saúde.

De acordo com o Manual do Departamento de Controle de Infecção do HSVP, a partir de 2009, os cuidados hospitalares devem ser tomados para evitar a disseminação de cepas multirresistentes, que inclui precauções de contato para pacientes colonizados e/ou infectados, o uso de aventais com mangas longas e uso adequado de luvas de procedimento e de higiene das mãos com água e antisséptico ou álcool gel antes e depois de atender esses pacientes, o uso individual de termômetros, estetoscópios e esfigmomanômetros, individual ou grupo de controle, dentro do hospital,⁽¹⁴⁾ além da fiscalização das ações de assepsia das unidades de terapia intensiva (UTIs).

O resultado obtido no estudo é favorável para o hospital, pois indica que não há colonização por ERC (supostamente KPC) nos pacientes das Unidades de Terapia Intensiva, o que reduz o risco de infecção hospitalar e de transmissão entre os pacientes. Apesar da inexistência de pacientes colonizados por ERC entre os analisados nesta pesquisa, as coletas de cultura de vigilância epidemiológica devem continuar a ser realizadas a fim de se detectarem precocemente pacientes colonizados. Além disso, a coleta realizada no 1º, 7º, 14º e 21º dia permite que se avalie se o paciente chega ao HSVP colonizado e ou se a colonização ocorre durante o período de internação.

Isso também é favorável porque reduz os gastos hospitalares com o tratamento desse patógeno multirresistente e isolamento de pacientes, pois os antimicrobianos utilizados são de custo elevado e a colonização exige a prolongação da internação do paciente, entre outros gastos.

CONCLUSÃO

Durante o período de estudo, não foram encontrados pacientes colonizados por ERC nas UTIs estudadas, o que não exclui a importância e a necessidade da continuidade das coletas de vigilância epidemiológica para pesquisa de ERC. Considerando as confirmações recentes de infecções causadas por bactérias produtoras de KPC em diferentes localidades do Brasil, tornou-se importante sua pesquisa para controlar e reduzir a sua disseminação.

Agradecimentos

Agradeço a realização deste trabalho, primeiramente, a Deus, pela força em todos os momentos difíceis. À minha família, pela oportunidade de fazer o curso de Farmácia e pelo constante amparo durante todo o período de estudos. Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e a Comissão de Controle de Infecção do Hospital São Vicente de Paulo que permitiram o desenvolvimento deste estudo, pelo auxílio prestado durante toda a realização desta pesquisa. E, finalmente, a professora orientadora Dra. Daiane Bopp Fuentesfria, pela confiança e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Abstract

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) is an important mechanism of resistance in hospitals worldwide and is involved in more serious infection cases, especially in Intensive Care Units (ICU), being an opportunistic bacteria. KPC's research is relevant in order to warn about the spread of antimicrobial resistance, contributing to the reduction of morbidity and mortality associated with various infectious diseases. The KPC is an enzyme produced by Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family and its presence may confer resistance to carbapenem antibiotics, and inactivate penicillins, cephalosporins and monobactams. This study surveyed 136 clinical isolates of ICU patients from a tertiary hospital in the northern of Rio Grande do Sul, performing the disk diffusion test with imipenem and meropenem, using

as positive control a strain of *Acinetobacter baumannii* producing VIM and *Escherichia coli* ATCC 25922 as a negative control. Of 136 cultures assayed within one month, there were no positive cultures for ERC (Enterobacterial Resistant to Carbapenems) indicating the absence of colonization by KPC in the cultures of patients in ICUs studied, which does not exclude the importance and need for continued surveillance of the collection.

Keywords

Klebsiella pneumoniae carbapenemases; Bacterial resistance to antimicrobial drugs; Hospital infection

REFERÊNCIAS

1. Dienstmann R, Picoli SU, Meyer G, Schenke T, Steyer J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *J Bras Patol Med Laboratorial*. 46: 23-27, 2010.
2. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2723-5.
3. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, Natoli S, Altieri A, Bossa MC, et AL. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy *BMC Res Notes*. 2010 Feb 23;3:40.
4. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC.. First Report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):333-4.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Enzima KPC: entenda o que é. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home!/ut>. Acesso em: outubro de 2010.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad77d15359461/nota+tecnica+kpc.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: outubro de 2010.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Brasília, Distrito Federal, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia>. Acesso em: outubro de 2010.

8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com material biológico / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 306 de 07 de dezembro de 2004.
10. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):776-8.
11. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J.. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium.. *Arch Intern Med*. 2005 Jun 27;165(12):1430-5.
12. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):3098-101.
13. CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Table: M100 - S19; 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, PA 19087-1898 USA, 2009.
14. Barbosa GL, Schlichting D, Oliveira DR, De Paula NN. Manual do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar. Hospital São Vicente de Paulo; 2009.

Correspondência

Daiane Bopp Fuentefria

Serv. Análises Especializadas/Laboratório SANI.

Avenida Brasil Oeste, 888 – Centro,

99010-001 – Passo Fundo, RS, Brasil

Telefone/Fax 55 54 3312-2000

E-mail: daiane@gruposani.com.br

Bactérias anaeróbias em processos infecciosos: ocorrência e significado clínico

Anaerobic bacteria in infectious processes: occurrence and clinical significance

Maristela de Paiva^{1,2}

Laura Lúcia Cogo¹

Gislene Maria Botão Kussen¹

Maria Estela Mosqueira Lima¹

Helena A.P.H. M. de Souza¹

Alessandro R. Rosa¹

Rosália Rubel¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar os principais patógenos anaeróbios obrigatórios associados a processos infecciosos. **Metodologia:** Foram avaliados 408 espécimes clínicos provenientes de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Curitiba, PR, no período de 2002 a 2010. **Resultados:** Bactérias anaeróbias foram isoladas de 108 espécimes clínicos (26,5%). A maioria das amostras positivas (65,7%) apresentou cultivo misto contendo bactérias anaeróbias e facultativas, enquanto que no restante das amostras (34,3%) foram isoladas apenas bactérias anaeróbias. Foram isoladas 139 bactérias anaeróbias, resultando em uma ocorrência de 1,3 por amostra. A amostra clínica que apresentou maior positividade foi secreção proveniente de abscessos (41,7%). Bacilos Gram negativos foram os mais isolados (70,5%), com predomínio do grupo *Bacteroides fragilis* (60,4%), seguido por *Bacteroides* sp. (5,8%) e BGN pigmentados (*Porphyromonas* e *Prevotella*) (2,9%). Entre os Gram positivos foram isolados *Peptostreptococcus* sp. (13,7%), bacilos Gram positivos esporulados, incluindo *Clostridium perfringens* (8,6%) e *Clostridium* sp. (5,0%) e não esporulados (*Propionibacterium acnes*, *Bifidobacterium* e *Eubacterium*) (2,2%). **Conclusão:** Bactérias anaeróbias estão implicadas em vários processos infecciosos e sua identificação, apesar de pouco empregada, muitas vezes representa uma etapa decisiva no diagnóstico microbiológico.

Palavras-chave

Bactérias anaeróbias; Infecção polimicrobiana; *Bacteroides fragilis*

INTRODUÇÃO

Na prática laboratorial, bactérias anaeróbias são definidas como sendo microrganismos que requerem uma reduzida tensão de oxigênio para seu crescimento e não se desenvolvem na superfície de meios de cultura em atmosfera aeróbia normal.

O termo anaeróbio tem sido definido por diferentes autores com base na quantidade de oxigênio que as bactérias podem suportar. Bactérias anaeróbias estritas não apresentam crescimento na superfície de agar em atmosfera contendo mais de 0,5% de oxigênio. Bactérias anaeróbias moderadas toleram níveis de oxigênio entre 2% a 8%.⁽¹⁾

As bactérias anaeróbias são isoladas de todos os sítios anatômicos do corpo humano onde existe microbiota normal, formando complexos sistemas ecológicos, juntamente com outros tipos respiratórios

bacterianos. A maioria das infecções por bactérias anaeróbias é geralmente de origem endógena e polimicrobiana, sendo que o número de isolados pode ser de cinco a dez organismos no mesmo processo infeccioso.⁽²⁾

As infecções anaeróbias geralmente são causadas por bactérias anaeróbias moderadas, sendo que os principais patógenos isolados pertencem aos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* entre outros.⁽³⁾ O tratamento dessas infecções deve levar em consideração o crescimento bacteriano lento e fastidioso, a natureza polimicrobiana e as elevadas taxas de resistência a antimicrobianos. A terapia antimicrobiana empregada é principalmente empírica e baseada em dados obtidos através de estudos epidemiológicos multicêntricos.⁽⁴⁾

Devido à complexidade dos processos de isolamento e identificação das bactérias anaeróbias, nem todos

¹Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

²Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

Artigo recebido em 01/07/2012

Artigo aprovado em 16/02/2016

os laboratórios pesquisam rotineiramente esses organismos. Deste modo, a ocorrência de bactérias anaeróbias em materiais clínicos, frequentemente é subestimada e os dados epidemiológicos são escassos.

O objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de bactérias anaeróbias em diferentes processos infecciosos provenientes de pacientes internados do Hospital de Clínicas de Curitiba, PR, durante o período de 2002 a 2010. Apenas as bactérias que cresceram unicamente em anaerobiose foram incluídas neste trabalho, com exceção das cepas de *Propionibacterium acnes* isoladas de hemocultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram analisadas 408 amostras provenientes de pacientes com suspeita clínica de infecção por bactérias anaeróbias. Espécimes clínicos provenientes de abscessos foram coletados por meio de técnica cirúrgica, ou por punção asséptica, e enviadas ao laboratório em meio de transporte tipo Amies (Newprov, Curitiba, PR, Brasil).

Amostras de sangue foram semeadas em frasco de hemocultura e incubadas em aparelho automatizado BactAlert (bioMérieux, França). Amostras sólidas foram obtidas por biópsia e enviadas ao laboratório em frasco estéril no espaço de 30 minutos.

Processamento inicial

O exame direto das amostras foi realizado pela coloração de Gram, o que permitiu a avaliação das características morfológicas da microbiota presente no material.

Meios de cultura

As amostras foram semeadas para pesquisa de bactérias anaeróbias-facultativas em agar sangue (5% de hemácias carneiro), agar MacConkey e agar chocolate. Para recuperação da maioria das bactérias anaeróbias, utilizou-se o agar sangue infuso de cérebro e coração suplementado (*Brain Heart Infusion Supplemented - BHIS*).

O agar sangue álcool feniletílico suplementado (*Phenylethyl Alcohol Ágar - PEA*) foi utilizado com o propósito de selecionar as bactérias anaeróbias Gram positivas e inibir o crescimento invasivo de cepas de *Proteus* sp.

Para isolamento de membros do grupo *B. fragilis* foi utilizado o agar Bacteroides Bile Esculina (BBE), contendo gentamicina 0,1 mg/mL.⁽⁵⁾ Os meios de cultura para pesquisa de anaeróbios foram suplementados com hemina (5 µg/mL) e menadiona (10 µg/mL para meios sólidos e 0,1 µg/mL para meios líquidos). Antes da

inoculação, os meios foram mantidos em atmosfera anaeróbia, por um período de duas horas. As amostras líquidas, como líquido pleural, ascítico, pericárdico e outros, quando coletadas em volume suficiente, foram semeadas na proporção 1:10 em frascos para hemocultura, contendo 45 mL de caldo soja tripticaseína. Volumes menores foram inoculados em tubos contendo 5 mL de caldo tioglicolato suplementado e repicados para meios sólidos após 48 horas de incubação.

Condições de incubação

Os meios de cultura semeados foram incubados a 35°C por 24-48 horas para recuperação de bactérias facultativas e por até cinco dias para anaeróbios. O agar MacConkey e o ágar sangue foram incubados em atmosfera de aerobiose, enquanto que o agar chocolate foi incubado em atmosfera com 5% a 10% de gás carbônico. Os meios de cultivo para anaeróbios foram incubados em jarra bacteriológica.

A atmosfera de anaerobiose foi obtida no interior da jarra pela introdução da mistura gasosa constituída de 80%-85% de nitrogênio, 5%-10% de gás carbônico e 5%-10% de hidrogênio, após duas lavagens prévias com nitrogênio, empregando *paladium* como catalisador da reação.⁽⁵⁾

O controle da atmosfera anaeróbia foi monitorado pelo emprego de 1g de uma mistura contendo bicarbonato de sódio (NaH₂CO₃) – 22,6 g; glicose – 2,5 g; e azul de metileno –1 mg, dissolvidos em 5 mL de água. O azul de metileno em estado reduzido apresenta-se incolor e, quando oxidado, permanece azul.⁽⁶⁾ O repique da cepa controle *B. fragilis* ATCC 25285 garantiu o controle total das condições anaeróbias obtidas dentro da jarra de cultivo.

Identificação bacteriana

As culturas que apresentaram crescimento bacteriano em anaerobiose foram testadas quanto à aerotolerância para determinação do tipo respiratório. Para cada tipo morfológico de colônia bacteriana foram realizados uma coloração de Gram e o teste de aerotolerância, que consiste no subcultivo da colônia em uma placa de BHIS-suplementado incubada em anaerobiose, e duas placas de agar sangue incubadas em aerobiose e microaerofilia, respectivamente. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. As bactérias que se desenvolveram unicamente em anaerobiose foram classificadas como anaeróbias obrigatórias.⁽⁷⁾

A identificação do gênero e espécie foi realizada por meio de provas bioquímicas e características fisiológicas de crescimento.

A identificação presuntiva de bacilos Gram negativos (BGN) anaeróbios utilizou como parâmetro inicial o

desenvolvimento de colônias pretas no agar BBE, que caracteriza o grupo *B. fragilis*, indicando hidrólise da esculina e resistência à bile. A ausência de crescimento em BBE (inibidos pela bile), desenvolvimento de colônias com fluorescência vermelho tijolo (UV-366 nm) ou produção de pigmento preto em agar sangue suplementado após quatro a cinco dias de incubação anaeróbia caracterizou BGN produtores de pigmento (gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*). BGN anaeróbios sensíveis a bile e sem pigmento foram caracterizados como *Bacteroides* sp., e os que possuíam características morfotintórias como bacilos fusiformes foram presuntivamente identificados como *Fusobacterium* sp. Cocos Gram positivos (CGP) anaeróbios foram primeiramente caracterizados como pertencentes ao gênero *Peptostreptococcus* e identificados ao nível de espécie através das reações de indol e nitrato.

Bacilos Gram positivos (BGP) anaeróbios esporulados foram caracterizados como *C. perfringens* baseando-se na reação positiva para lecitinase em agar gema de ovo (Egg Yolk Agar) e presença de dupla zona de hemólise em agar sangue suplementado. Cepas de BGP anaeróbios esporulados que não apresentaram essas características foram identificados apenas ao nível de gênero como *Clostridium* sp. Os BGP anaeróbios não esporulados foram identificados presuntivamente em base nas reações de indol, nitrato e catalase.^(5,7)

Adicionalmente, as cepas de bactérias anaeróbias foram confirmadas pelo sistema automatizado Vitek-2, através do cartão ANC (bioMérieux - França).⁽⁸⁾

RESULTADOS

Nas 408 amostras clínicas analisadas foram isoladas bactérias anaeróbias em 108 delas, correspondendo a 26,5% de positividade. Em 65,7% (n=71) dessas culturas foram isolados simultaneamente bactérias facultativas e anaeróbias, caracterizando infecções polimicrobianas mistas. Em 34,3% (n=37) dos processos infecciosos foram isoladas apenas bactérias anaeróbias, sendo que, dessas, 26,9% (n=29) foram infecções monomicrobianas e 7,4% (n=8) infecções anaeróbias mistas (Figura 1).

Nas 108 amostras analisadas, a maior positividade para bactérias anaeróbias foi encontrada em aspirado de abscessos (41,7%), em seguida em secreções diversas (20,4%), líquidos cavitários (17,6%), sangue (16,7%), material de biópsia (1,8%) e bile (1,8%). Nessas amostras clínicas foram identificadas 139 cepas bacterianas, resultando uma ocorrência de 1,3 bactérias anaeróbias por amostra (Tabela 1).

A maioria dos isolados bacterianos foi constituída por BGN que corresponderam a 70,5% do total, enquan-

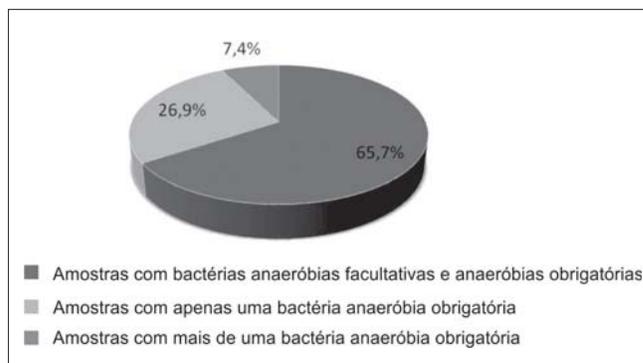


Figura 1. Ocorrência de diferentes tipos respiratórios bacterianos em processos infecciosos, incluindo bactérias anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias, em 108 amostras clínicas provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas de Curitiba, PR

Tabela 1 - Relação entre as amostras clínicas (n=108) e bactérias anaeróbias (n=139) isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas de Curitiba, PR

Amostra	Amostras Positivas	Cepas Isoladas	Isolamentos/ Amostras
Abscessos	41,7% (n=45)	56	1,2
Secreções	20,4% (n=22)	34	1,5
Líquidos cavitários ¹	17,6% (n=19)	25	1,3
Sangue	16,7% (n=18)	18	1,0
Biópsia	1,8% (n=2)	3	1,5
Bile	1,8% (n=2)	3	1,5
Total	n=108	139	1,3

¹líquidos peritoneal e pleural

to que 29,5% foram bactérias Gram positivas. Entre os BGN, espécies do grupo *B. fragilis* foram os mais frequentes (60,4%), seguidas de *Bacteroides* sp. (5,8%), BGN pigmentados dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* (2,9%) e *Fusobacterium* sp. (1,4%). CGP do gênero *Peptostreptococcus* (*P. indolicus*, *P. assacharolyticus*) corresponderam a 13,7% dos isolados. Entre os BGP esporulados foram isolados *C. perfringens* (8,6%) e *Clostridium* sp. (5,0%). BGP não esporulados (*P. acnes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*) corresponderam a 2,2% dos isolados (Tabela 2).

Os materiais clínicos provenientes de abscessos proporcionaram maior riqueza quantitativa e qualitativa de isolamentos, seguindo-se as amostras clínicas provenientes de secreções e líquidos cavitários. Nas 18 hemoculturas positivas para bactérias anaeróbias, foram isoladas cinco tipos de bactérias anaeróbias, incluindo grupo *B. fragilis* (n=11), *C. perfringens* (n=4) *Clostridium* sp. (n=1), *Peptostreptococcus* sp. (n=1) e *Fusobacterium* sp. (n=1).

A origem dos isolados bacterianos e a positividade por material clínico são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Distribuição por gêneros e espécies das 139 bactérias anaeróbias isoladas de 108 amostras clínicas provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas de Curitiba, PR

Grupos bacterianos	Gêneros e espécies	Nº de isolados (%) ¹
BGN	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	84 (60,4%)
	<i>Bacteroides</i> sp.	8 (5,8%)
	BGN pigmentados (<i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i>)	4 (2,9%)
	<i>Fusobacterium</i> sp.	2 (1,4%)
	Total de Gram negativos	98 (70,5%)
CGP	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	19 (13,7%)
BGP esporulados	<i>Clostridium perfringens</i>	12 (8,6%)
	<i>Clostridium</i> sp.	7 (5,0%)
BGP não esporulados	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eubacterium</i>	3 (2,2%)
	Total de Gram positivos	41 (29,5%)

¹Percentual em relação ao total de espécimes analisadas

Tabela 3 - Bactérias anaeróbias isoladas de 108 amostras clínicas provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas de Curitiba, PR

Tipos bacterianos	Espécimes clínicos						Total
	Abscesso	Secreção	Líq. cavit. ³	Sangue	Biópsia	Bile	
Grupo <i>B. fragilis</i>	39	14	16	11	02	02	84
<i>Bacteroides</i> sp.	01	07	0	0	0	0	08
BGN pigmentados ¹	02	01	01	0	0	0	04
<i>Fusobacterium</i>	0	0	01	01	0	0	02
<i>Peptostreptococcus</i>	10	05	02	01	01	0	19
<i>C. perfringes</i>	03	02	02	04	0	01	12
<i>Clostridium</i> sp.	0	03	03	01	0	0	07
BGP não espor. ²	01	02	0	0	0	0	03
Total	56	34	25	18	03	03	139

¹*Porphyromonas* e *Prevotella*, ²BGP não esporulados: *P. acnes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, ³Líquidos cavitários: líquidos peritoneal e pleural

DISCUSSÃO

As bactérias anaeróbias são agentes etiológicos clássicos de infecções em humanos e sua caracterização tem sido um grande desafio laboratorial.

Nas 108 amostras analisadas, 65,7% apresentaram cultivo misto, demonstrando a característica polimicrobiana das infecções anaeróbias. Resultados equivalentes obtidos por outros autores atestam a associação sinérgica bacteriana existente nas infecções anaeróbias.^(3,9) Neste trabalho, em 34,3% dos casos houve apenas o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, reforçando o objetivo primordial do diagnóstico definitivo em casos da presença exclusiva de patógenos anaeróbios (Figura 1).

O número de anaeróbios encontrados foi superior ao número de amostras clínicas, levando a uma média de 1,3 isolados por amostra (Tabela 1). Valores superiores foram

encontrados em estudos realizados por Quesada-Gómez et al.⁽¹⁰⁾ e Brook e Frazier⁽¹¹⁾ os quais obtiveram respectivamente 2,1 e 1,7. Esta diferença pode ser explicada devido ao tipo de material pesquisado, pois neste trabalho foram incluídas outras amostras clínicas que não intra-abdominais, como, por exemplo, sangue, onde usualmente se isola apenas um patógeno.

Em concordância com outros estudos,^(12,13) as bactérias mais encontradas foram as Gram negativas (Tabela 2), embora outros autores relatem um maior isolamento de Gram positivos.⁽¹⁴⁾

O microrganismo mais isolado foi do grupo *B. fragilis* (60,4%), encontrado em todos os tipos de amostras clínicas analisadas. Este fato é confirmado por outros autores,^(15,16) que o apontam como o principal patógeno anaeróbio de importância clínica. A bactéria é geralmente isolada de infecções de origem endógena e sua patogenicidade tem sido atribuída a vários determinantes de

virulência,⁽¹⁷⁾ incluindo uma enterotoxina presente em algumas cepas e que está associada à oncogênese de câncer de cólon.⁽¹⁸⁾

As amostras clínicas provenientes de região abdominal apresentaram uma variada microbiota bacteriana, com predomínio de integrantes do grupo *B. fragilis* (dados não mostrados). Outros trabalhos demonstram as infecções intra-abdominais como uma fonte comum de isolados anaeróbios, estando geralmente associadas à contaminação da cavidade peritoneal por conteúdo intestinal.⁽¹⁹⁾

Os BGN pigmentados (incluindo os gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*) foram isolados em baixa quantidade neste trabalho (2,9%). Outros autores citam este grupo como o menos frequente dos Gram negativos.⁽¹⁰⁾ De acordo com Hsu et al.⁽²⁰⁾ *Prevotella bivia* tem sido associada à doença inflamatória pélvica e infecções fulminantes em imunocomprometidos.

Fusobacterium sp. (1,4%) foi o menos isolado entre os BGN, sendo apenas encontrado em líquido cavitário (líquido pleural) e sangue. Trabalhos realizados por outros autores confirmam este achado.^(3,14) Marti et al.⁽²¹⁾ demonstraram *Fusobacterium* em associação com outras bactérias causando pericardite purulenta, uma doença rara, mas associada a altas taxas de mortalidade.

Entre os Gram positivos mais isolados está *Peptostreptococcus* sp. (13,7%). Infecções por essa bactéria podem ocorrer em todos os sítios anatômicos, porém são mais frequentes em região de cabeça e pescoço, envolvendo a microbiota da cavidade oral, vias aéreas superiores, ouvido e faringe. Particularmente em sinusites, o envolvimento de bactérias anaeróbias contribui para a cronicidade do processo inflamatório.⁽²²⁾

Nas amostras de sangue, *C. perfringens* foi o segundo patógeno mais encontrado, demonstrando sua característica invasiva como agente etiológico em bacteriemia.⁽²³⁾ A bactéria também esteve presente em outros materiais biológicos estudados, como bile. Lupinacci et al.⁽²⁴⁾ relatam o isolamento de *C. perfringens* em bile de paciente com colecistite. Outras espécies de *Clostridium* foram encontradas, porém em menor quantidade.

Neste trabalho, o isolamento de *P. acnes* foi considerado como simples contaminante, embora a literatura relate processos infecciosos causados por esta bactéria.^(25,26) Cheung et al.⁽²⁷⁾ relatam *P. acnes* participando de infecções polimicrobianas em pacientes submetidos à artroplastia de ombro. Segundo Nisbet et al.⁽²⁸⁾ *P. acnes* está implicado em processos infecciosos neurocirúrgicos.

A natureza das bactérias isoladas, associada às dificuldades encontradas para a realização da metodologia de cultivo de anaeróbios, faz com que poucos laboratórios realizem sua análise. Acreditamos que a pesquisa de bactérias anaeróbias em amostras clínicas é relevante para o êxito terapêutico e formação de um perfil epidemiológico.

Agradecimentos

À Dra. Mônica Evelise da Silveira, gerente da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, por ter permitido a realização da pesquisa.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas da UFPR com o registro CEP 2346.240/2010-10.

Abstract

The aim of this study was to identify the main obligate anaerobic pathogens associated with infection processes. **Methods:** Were evaluated 408 clinical specimens from inpatients of Clinical Hospital, in Curitiba, from 2002 to 2010. **Results:** Obligate anaerobic bacteria were isolated from 108 clinical specimens (26.5%). Most positive samples (65.7%) showed mixed cultures with anaerobic and facultative bacteria, whereas in the remainder samples (34.3%) were isolated only anaerobic bacteria. Were isolated 139 anaerobic bacteria, resulting an occurrence of 1.3 per sample. The clinical sample that showed the highest positivity was secretion from abscess (41.7%). Gram-negative rods were the most isolated (70.5%), with predominance of *Bacteroides fragilis* group (60.4%), followed by *Bacteroides* sp. (5.8%) and pigmented BGN (*Prevotella* and *Porphyromonas*) (2.9%). Among the Gram-positives were isolated *Peptostreptococcus* sp. (13.7%), sporeforming Gram-positive rods including *Clostridium perfringens* (8.6%) and *Clostridium* sp. (5.0%), and non-sporeforming rods (*Propionibacterium* acnes, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*) (2.2%). **Conclusion:** Anaerobic bacteria are implicated in various infectious processes and their identification, although not widely performed, often represents a decisive stage in the microbiological diagnosis.

Keywords

Anaerobic bacteria; Polymicrobial infection; *Bacteroides fragilis*

REFERÊNCIAS

- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML and Pfaller MA (ed.). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
- Hung MN, Chen SY, Wang JL, Chang SC, Hsueh PR, Liao CH, Chen YC. Community-acquired anaerobic bacteremia in adults: one-year experience in a medical center. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005 Dec;38(6):436-43.
- Brook I. Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. *J Clin Microbiol.* 1988 Jun;26(6):1181-8.
- Papaparaskevas J, Pantazatou A, Katsandri A, Houhoula DP, Legakis NJ, Tsakris A, Avlami A. Moxifloxacin resistance is prevalent among *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jul;62(1):137-41.
- Utter VL, Citron DM, Edelstein MAC, et al. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 4^a ed. Belmont: Star Publishing. 1985. p. 79-89.
- Drollette DD. Anaerobic indicators: a review. *Am J Med Technol.* 1969 Dec;35(12):758-60
- Holdeman LV, et al. Anaerobic laboratory manual. 3^a ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg: Southern Printing, 1975. 132 p.
- Lee EH, Degener JE, Welling GW, Veloo AC. Evaluation of the Vitek 2ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 2011 May;49(5):1745-9.
- Lu Y, Xiang TH, Shi JS, Zhang BY. Bile anaerobic bacteria detection and antibiotic susceptibility in patients with gallstone. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003 Aug;2(3):431-4.

10. Quesada-Gómez C, Gamboa Coronado MM, Rodríguez-Cavallini E. Bacterias anaerobias como agentes etiológicos de infecciones intraabdominales en un hospital de Costa Rica. *Rev. Panam. Infect.* 2008;10 (4):13-7.
11. Brook I, Frazier EH. Aerobic and anaerobic microbiology in intra-abdominal infections associated with diverticulitis. *J Med Microbiol.* 2000 Sep;49(9):827-30.
12. Goldstein EJ, Citron DM, Vaidya SA, Warren YA, Tyrrell KL, Vreni Merriam C, Fernandez H. In vitro activity of 11 antibiotics against 74 anaerobes isolated from pediatric intra-abdominal infections. *Anaerobe.* 2006 Apr;12(2):63-6.
13. Lin WJ, Lo WT, Chu CC, Chu ML, Wang CC. Bacteriology and antibiotic susceptibility of community-acquired intra-abdominal infection in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006 Jun;39(3):249-54.
14. Quesada-Gómez C, Rodríguez-Cavallini E, Gamboa Coronado MM. Bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas de un hospital regional de adultos de Costa Rica. *Rev Biomed.* 2007;18:89-95.
15. Edmiston CE, Krepel CJ, Seabrook GR, Somberg LR, Nakeeb A, Cambria RA, Towne JB. In vitro activities of moxifloxacin against 900 aerobic and anaerobic surgical isolates from patients with intra-abdominal and diabetic foot infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):1012-6.
16. Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Søggaard P, Justesen T. 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):946-8.
17. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faruque AS, et al. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2008 Sep 15;47(6):797-803.
18. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1016-22.
19. Brook I. Microbiology and management of intra-abdominal infections in children. *Pediatr Int.* 2003 Apr;45(2):123-9.
20. Hsu GJ, Chen CR, Lai MC, Luh SP. Chest wall abscess due to *Prevotella bivia*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009 Mar;10(3):233-6.
21. Marti V, Garrido P, Seixo F, Peset A, Gineli A. Purulent pericarditis with cardiac tamponade caused by anaerobic agents. *Rev Port Cardiol.* 2008 Jul-Aug;27(7-8):959-64. [Article in English, Portuguese]
22. Brook I, Frazier EH, Foote PA. Microbiology of transition from acute to chronic maxillary sinusitis. *J Med Microbiol.* 1996 Nov;45(5):372-5.
23. Fujita H, Nishimura S, Kurosawa S, Akiya I, Nakamura-Uchiyama F, Ohnishi K. Clinical and epidemiological features of *Clostridium perfringens* bacteremia: a review of 18 cases over 8 year-period in a tertiary care center in metropolitan Tokyo area in Japan *Intern Med.* 2010;49(22):2433-7.
24. Lupinacci RM, Chafai, N, Tired E. Emphysematous cholecystitis. *ABCD, arq. bras. cir. dig.,* Dec 2009;22(4):235-6.
25. Haidar R, Najjar M, Der Boghossian A, Tabbarah Z. Propionibacterium acnes causing delayed postoperative spine infection: review. *Scand J Infect Dis.* 2010 Jul;42(6-7):405-11.
26. Kranick SM, Vinnard C, Kolson DL. Propionibacterium acnes brain abscess appearing 10 years after neurosurgery. *Arch Neurol.* 2009 Jun;66(6):793-5.
27. Cheung EV, Sperling JW, Cofield RH. Infection associated with hematoma formation after shoulder arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Jun;466(6):1363-7.
28. Nisbet M, Briggs S, Ellis-Pegler R, Thomas M, Holland D. Propionibacterium acnes: an under-appreciated cause of post-neurosurgical infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Nov;60(5):1097-103.

Correspondência

Rosália Rubel

Rua Brigadeiro Franco, 1909

80420-200 – Curitiba, PR

E-mail: r.rubel@hotmail.com

Morfotipagem de leveduras isoladas de secreção vaginal preservadas sob óleo mineral na micoteca URM

Morphotyping of yeasts isolated from vaginal secretions preserved under mineral oil at the micoteca URM

Bruno Severo Gomes¹

Adriana Nunes de Lima¹

Cristina Maria de Souza Motta¹

Viviana Giampaol²

Ana Lúcia Figueiredo Porto³

Resumo

Com o objetivo de caracterizar leveduras isoladas de secreção vaginal como ferramenta epidemiológica para estabelecer a identidade e a relação das espécies através da morfotipagem, foram utilizadas trinta amostras de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Kloeckera*. A suspensão de leveduras obtidas de colônias crescidas em ágar Sabouraud dextrose à temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1° C) por 48 horas foi padronizada na escala 3 de MacFarland. Semeou-se a suspensão em estrias de aproximadamente 5 mm de largura por 25 mm de comprimento na superfície de placas contendo ágar malte mantidas à temperatura ambiente por dez dias. Após esse período, foram avaliados os aspectos macromorfológicos das colônias, como a presença de franjas e as características da sua superfície, aplicando-se a codificação de acordo com o modelo de tipificação. A morfotipagem permitiu a identificação de 17 morfotipos diferentes, com o predomínio dos morfotipos 000000 e 524032. Os resultados obtidos permitem concluir que os morfotipos apresentam diferenças significativas, independente da espécie, presença ou ausência de sintomas, sendo importantes para estudos epidemiológicos, terapêuticos e de variação morfológica.

Palavras-chave

Leveduras; Secreção vaginal; Morfotipagem

INTRODUÇÃO

As diferentes espécies de leveduras podem ser identificadas por meio de testes fisiológicos, morfológicos e bioquímicos. A caracterização dos isolados é necessária para a investigação epidemiológica, incidência de infecções, relação entre espécies, bem como recidivas.⁽¹⁾

Entre os métodos de fenotipagem, destaca-se a morfotipagem pelo método de avaliação das bordas e características da superfície de colônias de leveduras cultivadas em agar malte.⁽²⁾ O método já foi demonstrado no passado, mostrando boa capacidade discriminatória.⁽³⁾ A morfotipagem de espécies de *Candida* é capaz de distinguir mais de cem morfotipos. O código é simples e conveniente para expressar características morfológicas numericamente, fixando pontos de referência. Pela simplicidade e reprodutibilidade, é um valioso instrumento para estudos epidemiológicos de *Candida* e candidoses.⁽²⁾

Os métodos de avaliação morfológica não precisam de equipamentos especializados e apresentam-se como uma alternativa viável e de fácil execução. No entanto, para alguns autores, os métodos podem apresentar pouco poder discriminatório.⁽³⁾

Contudo, o método de morfotipagem de colônias de leveduras tem sido recentemente uma técnica recomendada como um método simples, que pode ser executado na rotina laboratorial quando outros métodos são impraticáveis devido a restrições de recursos.^(4,5)

Com a simplicidade, facilidade de execução e sem custos elevados para realização, as amostras de leveduras podem ser diferenciadas, pela sua morfologia, em culturas semeadas em estrias, em placas contendo agar malte. Após dez dias de incubação, cada espécie é examinada e o código determinado. O sistema proposto⁽²⁾ fornece códigos numéricos baseados principalmente na natureza, na extensão da franja marginal e na topografia da superfície da colônia.⁽⁶⁾

¹Departamento de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Estatística. Universidade de São Paulo – USP – São Paulo, SP, Brasil.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife, PE, Brasil.

Além disso, a morfotipagem é um bom instrumento usado como marcador morfológico, no qual, em estudos epidemiológicos, a margem descontínua é associada às espécies com características de patogenicidade e um aumento do risco de morte em caso de infecção profunda.⁽⁷⁾

Um problema frequentemente observado em relação à reprodutibilidade consiste em que, muitas vezes, a morfologia das colônias é afetada pela variação fenotípica observada *in vitro*.⁽⁸⁾

A alta frequência observada de variações morfológicas, não relacionadas com a genômica, tem sido demonstrada em casos de candidoses recorrentes e correlacionadas com sensibilidade a antifúngicos.^(9,10)

Os morfotipos não sofrem influência na concentração de células. Podem ser afetados por alterações do meio de cultivo e em condições de incubação. Se as placas forem incubadas dentro de sacos plásticos ou similares, para evitar a dessecação, a umidade elevada relativa favorece a expansão da camada superficial das células para a margem da estria, podendo, assim, alterar os caracteres da franja. A temperatura de incubação não demonstra diferenças de resultados quanto à temperatura ambiente ou a 30°C.⁽⁶⁾

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido realizados visando caracterizar e individualizar as leveduras, principalmente do gênero *Candida*, em virtude da necessidade de informações sobre a transmissão e a recorrência nos casos de vulvovaginites. Metodologias de tipagem também vêm sendo empregadas para avaliar o comportamento não somente da espécie, mas também de subpopulações da espécie.^(11,12)

A formação de diferentes texturas das franjas produzidas nas bordas das colônias e a topografia da superfície dessas colônias representam um fenômeno da variação morfológica expressa por diferentes isolados de leveduras, permitindo a sua distinção.⁽¹³⁾

A morfotipagem já foi usada para determinar se existem diferenças entre os isolados de *Candida albicans* em indivíduos saudáveis a partir de mucosa oral e de pacientes com candidose eritematosa. Independentemente da situação, a presença de uma prótese, ou de candidose, múltiplos morfotipos foram identificados em fumantes com prótese dentária superior e de fumantes sem prótese dentária e de não fumantes com candidose eritematosa, enquanto que um único morfotipo foi isolado de não fumantes apresentando mucosa oral saudável.⁽¹⁴⁾

A morfotipagem e a produção de enzimas proteolíticas foram utilizadas para a caracterização de 45 isolados de *C. albicans* de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, para estabelecer uma correlação entre a doença e suas propriedades fisiológicas. As 45 leveduras foram isoladas da pele, sangue, cavidade oral e órgãos genitais. O morfotipo padrão dos quatro grupos isolados mostrou uma correlação com a produção de proteinase.⁽¹⁵⁾

Em pesquisa realizada, a morfotipagem de 35 isolados de *C. albicans* da mucosa bucal de crianças com e sem síndrome de Down permitiu detectar nove diferentes morfotipos. O grupo teste (crianças com síndrome de Down) apresentou uma predominância de morfotipo com colônias com franjas contínuas, igual ou superior a 6 mm, com uma textura intermediária e de bom aspecto topográfico. No grupo de crianças sem síndrome de Down, foi observada uma maior incidência de morfotipos com colônias com franjas contínuas, igual ou superior a 2 mm, textura fina e de bom aspecto topográfico.⁽¹⁶⁾

Uma morfotipagem apresenta bom potencial discriminatório, mas não se pode esquecer da diversidade das espécies, devido à variação na morfologia da colônia dentro de cada espécie ou à morfologia comum a várias espécies.^(17,18)

Uma modificação foi proposta ao sistema de leitura a fim de se conseguir melhor reprodutibilidade, sendo então possível relacionar estirpes de virulência comprovadas com um distinto morfotipo. Este teste é realizado com base na avaliação de apenas quatro parâmetros simples de crescimento, tais como a distribuição marginal, largura, textura e topografia da superfície das colônias.⁽⁷⁾

Os métodos de tipagem de espécies de *Candida* têm sido utilizados para caracterizar melhor os aspectos biológicos apresentados por estas leveduras. Por isso, a caracterização fenotípica nos permite avaliar macroscopicamente a forma como estes microrganismos comportam-se como um elemento constituinte da microbiota tópica bem como o mecanismo de desencadeamento das infecções e parâmetros morfológicos, sorológicos, biológicos e de sensibilidade antifúngica.⁽¹⁹⁻²²⁾

A identificação de espécies de leveduras isoladas de amostras de secreção vaginal é importante, pois grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura não realiza testes específicos para identificação de espécie, ficando desta forma a identificação apenas do gênero, prejudicando, entre outras coisas, o conhecimento epidemiológico e o tratamento das leveduroses vaginais e sua morfotipagem.⁽²³⁾

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar leveduras isoladas de secreção vaginal como ferramenta epidemiológica para estabelecer a identidade e a relação das espécies de leveduras.

MATERIAL E MÉTODOS

Leveduras

As leveduras foram isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas e mulheres não grávidas com e sem sintomas, para averiguação de levedurose vulvovaginal (Tabela 1).

As pacientes eram provenientes da ginecologia, clínica médica e pediatria. As amostras de secreção va-

Tabela 1 - Amostras de leveduras isoladas de secreção vaginal no período de outubro de 2003 a agosto de 2004.

Registro Micoteca URM	Espécie
4987	<i>Candida albicans</i>
4990	<i>C. albicans</i>
4986	<i>C. albicans</i>
4979	<i>C. azyma</i>
4985	<i>C. geochares</i>
4975	<i>C. guilliermondii</i>
4976	<i>C. maritima</i>
4983	<i>C. membranaefaciens</i>
4982	<i>C. obtusa</i>
4984	<i>C. parapsilosis</i>
4970	<i>C. parapsilosis</i>
4972	<i>C. robusta</i>
4974	<i>C. sake</i>
6088	<i>C. salmanticensis</i>
4978	<i>C. shehatae</i>
6084	<i>C. tropicalis</i>
6090	<i>C. tropicalis</i>
6089	<i>C. tropicalis</i>
4989	<i>C. tropicalis</i>
4981	<i>C. tsuchiyae</i>
4980	<i>C. versatilis</i>
5002	<i>Kloeckera apiculata</i>
5092	<i>Rhodotorula glutinis</i>
6085	<i>R. minuta</i>
6086	<i>R. minuta</i>
6087	<i>R. minuta</i>
4971	<i>R. graminis</i>
4988	<i>R. pallida</i>
6083	<i>R. rubra</i>
4973	<i>Trichosporon cutaneum</i>

ginal foram coletadas entre os meses de outubro de 2003 a agosto de 2004, no Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, no bairro de Arthur Lundgren I, em Paulista, PE.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, protocolo nº 304/2003-CEP/CCS.

Foram utilizadas trinta amostras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Kloeckera*. Todas as leveduras encontram-se depositadas na Micoteca-URM, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e foram submetidas à confirmação taxonômica de acordo com os critérios clássicos com os quais se baseiam em provas morfológicas e fisiológicas.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Morfotipagem

A suspensão de leveduras obtidas de colônias crescidas em agar Sabouraud dextrose à temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1°C) por 48 horas foi padronizada na escala 3 de MacFarland. Semeou-se a suspensão em estrias de aproximadamente de 5 mm de largura por 25 mm de comprimento na superfície de placas contendo agar malte mantidas à temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1°C) por dez dias.

Após esse período, foram avaliados os aspectos macromorfológicos das colônias, como a presença de franjas e as características da sua superfície, aplicando-se a codificação de acordo com o modelo de tipificação aplicado.⁽²⁾

A avaliação estatística consistiu em apresentação dos eventos em números absolutos, percentuais e médias, sendo empregado o teste exato de Fisher para a associação das variáveis apresentando significância (p<0,05).

RESULTADOS

A morfotipagem das leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas com e sem sintomas e não grávidas com e sem sintomas de levedurose vaginal permitiu a identificação de 17 morfotipos diferentes, com o predomínio dos morfotipos 000000 (distribuição, largura, textura da franja ausente, topografia da superfície da estria lisa, qualidade e profundidade ausente) observado em 23% dos isolados (7/30) e 524032 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura delicada, topografia da superfície da estria lisa, com qualidade intermediária e profundidade plana e escassa), observado em 20% dos isolados (6/30) (Tabelas 2 e 3).

Entre as 18 amostras de leveduras isoladas da secreção vaginal de mulheres não grávidas com sintomas, 12 morfotipos foram identificados, com predomínio do morfotipo 000000, observado em 2,2% dos isolados (4/18). Os outros morfotipos foram: 524032 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura delicada, topografia da superfície da estria lisa, com qualidade intermediária e profundidade plana e escassa), observado em 16,7% (3/18); 000032 (distribuição, largura e textura da franja ausente, topografia da superfície da estria lisa, com qualidade intermediária e profundidade plana e escassa), observado em 5,55% (1/18); 000042 (distribuição, largura, textura da franja ausente, topografia da superfície da estria lisa, com qualidade fina ou estreita e profundidade plana e escassa), observado em 5,55% (1/18); 523036 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura intermediária, topografia da superfície da estria lisa, qualidade intermediária e profundidade espa-

Tabela 2 - Morfotipagem de leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas e não-grávidas, com e sem sintomas de levedurose vaginal, atendidas no ambulatório de ginecologia do Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, Paulista, PE

Registro Micoteca URM	Espécie	Mulheres					
		Aspectos primários (franja)			Aspectos secundários (superfície da estria)		
		Distribuição	Largura	Textura	Topografia	Qualidade	Profundidade
4987	<i>Candida albicans</i>	5	2	4	0	3	2
4990	<i>C. albicans</i>	5	2	4	0	3	2
4986	<i>C. albicans</i>	5	2	4	0	3	2
4979	<i>C. azyma</i>	0	0	0	0	3	2
4985	<i>C. geochares</i>	0	0	0	0	4	2
4975	<i>C. guilliermondii</i>	5	2	3	0	3	6
4976	<i>C. maritima</i>	5	3	4	0	3	8
4983	<i>C. membranaefaciens</i>	5	2	4	0	4	2
4982	<i>C. obtusa</i>	0	0	0	0	3	8
4984	<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0
4970	<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0
4972	<i>C. robusta</i>	5	3	4	6	3	2
4974	<i>C. sake</i>	0	0	0	0	0	0
6088	<i>C. salmanticensis</i>	0	0	0	6	2	2
4978	<i>C. shehatae</i>	5	2	4	0	4	2
6084	<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0
6090	<i>C. tropicalis</i>	5	2	4	1	4	2
6089	<i>C. tropicalis</i>	7	2	3	0	3	2
4989	<i>C. tropicalis</i>	5	2	4	5	3	2
4981	<i>C. tsuchiyae</i>	5	2	4	0	3	2
4980	<i>C. versatilis</i>	7	2	3	6	3	2
5002	<i>Kloeckera apiculata</i>	0	0	0	0	0	0
5092	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	0	0	0
6085	<i>R. minuta</i>	5	2	4	0	3	2
6086	<i>R. minuta</i>	5	2	4	0	3	2
6087	<i>R. minuta</i>	5	2	4	0	4	2
4971	<i>R. graminis</i>	0	0	0	0	0	0
4988	<i>R. pallida</i>	0	0	4	0	4	0
6083	<i>R. rubra</i>	5	2	3	6	3	2
4973	<i>Trichosporon cutaneum</i>	5	2	3	6	3	2

lhada), observado em 5,55% (1/18); 524042 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura delicada, topografia da superfície da estria lisa, com qualidade fina ou estreita e profundidade plana e escassa), observado em 11,1% (2/18); 000622 (distribuição, largura, textura da franja ausente, to-

pografia enrugada, qualidade grosseira e profundidade plana e escassa), observado em 5,55% (1/18); 524142 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura delicada, topografia nodular, com qualidade fina ou estreita e profundidade plana e escassa), observado em 5,55% (1/18); 723632 (dis-

Tabela 3 - Morfotipos identificados em leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas e não-grávidas, com e sem sintomas de levedurose vaginal, atendidas no ambulatório de ginecologia do Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, Paulista, PE

Registro Micoteca URM	Espécie	Morfotipos	Mulheres			
			Não grávidas		Grávidas	
			Com sintomas	Sem sintomas	Com sintomas	Sem sintomas
4987	<i>Candida albicans</i>	524032			+	
4990	<i>C. albicans</i>	524032	+			
4986	<i>C. albicans</i>	524032		+		
4979	<i>C. azyma</i>	000032	+			
4985	<i>C. geochares</i>	000042	+			
4975	<i>C. guilliermondii</i>	523036	+			
4976	<i>C. maritima</i>	534038		+		
4983	<i>C. membranaefaciens</i>	524042	+			
4982	<i>C. obtusa</i>	000038		+		
4984	<i>C. parapsilosis</i>	000000	+			
4970	<i>C. parapsilosis</i>	000000		+		
4972	<i>C. robusta</i>	534632			+	
4974	<i>C. sake</i>	000000	+			
6088	<i>C. salmanticensis</i>	000622	+			
4978	<i>C. shehatae</i>	524042	+			
4978	<i>C. shehatae</i>	524042	+			
6090	<i>C. tropicalis</i>	524142	+			
6089	<i>C. tropicalis</i>	723032			+	
4989	<i>C. tropicalis</i>	524532		+		
4981	<i>C. tsuchiyae</i>	524032	+			
4980	<i>C. versatilis</i>	723632	+			
5002	<i>Kloeckera apiculata</i>	000000		+		
5092	<i>Rhodotorula glutinis</i>	000000	+			
6085	<i>R. minuta</i>	524032	+			
6086	<i>R. minuta</i>	524032				+
6087	<i>R. minuta</i>	524042		+		
4971	<i>R. graminis</i>	000000		+		
4988	<i>R. pallida</i>	004040	+			
6083	<i>R. rubra</i>	523632	+			
4973	<i>Trichosporon cutaneum</i>	731626	+			

tribuição da franja contínua, crescimento filamentosamente paralelo, com largura menor ou igual a 2 mm, textura intermediária, topografia enrugada, qualidade intermediária e profundidade plana e escassa, observado em 5,55% (1/18); 004040 (distribuição, largura da franja ausente, textura delicada, topografia lisa, com qualidade fina ou estreita e profundidade ausente), observado em 5,55% (1/18); 523632 (distribuição da franja contínua, somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura

da franja ausente, topografia enrugada, qualidade intermediária e profundidade plana e escassa), observado em 5,55% (1/18); 731626 (distribuição da franja contínua, crescimento filamentosamente paralelo, largura de 3-5 mm, textura muito grosseira, topografia enrugada, qualidade grosseira e profundidade espalhada), observado em 5,55% (1/18) (Tabela 4).

Nas oito amostras de leveduras isoladas da secreção vaginal de mulheres não grávidas sem sintomas, seis

Tabela 4 - Percentual de morfotipos identificados em leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas e não-grávidas, com e sem sintomas de levedurose vaginal, atendidas no ambulatório de ginecologia do Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, Paulista, PE

	Mulheres							
	Não grávidas				Grávidas			
	Com sintomas		Sem sintomas		Com sintomas		Sem sintomas	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
524032	3	16.7	1	12.5	1	33.3	1	100
000032	1	5.55	-	-	-	-	-	-
000042	1	5.55	-	-	-	-	-	-
523036	1	5.55	-	-	-	-	-	-
534038	-	-	1	12.5	-	-	-	-
524042	2	11.1	1	12.5	-	-	-	-
000038	-	-	1	12.5	-	-	-	-
000000	4	22.2	3	37.5	-	-	-	-
534632	-	-	-	-	1	33.3	-	-
000622	1	5.55	-	-	-	-	-	-
524142	1	5.55	-	-	-	-	-	-
723032	-	-	-	-	1	33.3	-	-
524532	-	-	1	12.5	-	-	-	-
723632	1	5.55	-	-	-	-	-	-
004040	1	5.55	-	-	-	-	-	-
523632	1	5.55	-	-	-	-	-	-
731626	1	5.55	-	-	-	-	-	-

morfotipos foram identificados, com predomínio do morfotipo 000000, observado em 37,5% dos isolados (3/8). Os outros morfotipos identificados foram: o morfotipo anteriormente descrito, 524032, observado em 12,5% (1/8); 524042, observado em 12,5% (1/8); 534038 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura de 3-5 mm e textura delicada, com topografia lisa, qualidade intermediária e profundidade abundante), observado em 12,5% (1/8); 000038 (distribuição, largura, textura da franja ausente, topografia da superfície da estria lisa, qualidade intermediária e profundidade abundante), observado em 12,5% (1/8); 524532 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura menor ou igual a 2 mm, textura delicada, topografia crateriforme, qualidade intermediária e profundidade plana e escassa); observado em 12,5% (1/8) (Tabela 4).

Na amostra de levedura isolada da secreção vaginal de mulher grávida sem sintomas, o morfotipo identificado foi 524032 (Tabela 4).

Nas três amostras de leveduras isoladas da secreção vaginal de mulheres grávidas com sintomas, três morfotipos foram identificados. O morfotipo 524032, ob-

servado em 33,3% (1/3); 534632 (distribuição da franja contínua somente na superfície, com largura de 3-5 mm e textura delicada, topografia enrugada, qualidade intermediária e profundidade plana e escassa); observado em 33,3% (1/3); 723032 (distribuição da franja contínua, crescimento filamentosamente paralelo, com largura menor ou igual a 2 mm, textura intermediária, topografia lisa, qualidade intermediária e profundidade plana e escassa), observado em 33,3% (1/3) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A presença do morfotipo 524032 em todas as amostras de *C. albicans* difere dos resultados encontrados por Lima et al.,⁽²⁷⁾ onde o morfotipo mais comumente observado em amostras isoladas de secreção vaginal de mulheres com e sem sintomas de levedurose vaginal em Goiânia, GO foi 534000.

O morfotipo 524032 foi identificado não apenas em isolados de *C. albicans*, mas também para *C. tsuchiyae* (URM 4981), *R. minuta* (URM 6085), *R. minuta* (URM 6086) e *R. minuta* (URM 6087). O que foi também observado em relação ao morfotipo 000000, em que as características morfológicas foram compartilhadas por *C. parapsilosis* (URM 4984), *C. parapsilosis* (URM 4970), *C. sake* (URM 4974), *C. tropicalis* (URM 6084), *K. apiculata* (URM 5002), *R. graminis* (URM 4971) e *R. glutinis* (URM 5092), mostrando, assim, que um mesmo morfotipo pode ser compartilhado por espécies diferentes, presentes na mucosa vaginal, independente da condição fisiológica e presença de sintomas. Ou a mesma espécie apresentar variações morfológicas, como identificado nos quatro isolados de *C. tropicalis*, cada um com um morfotipo particular.

A presença significativa de um determinado morfotipo em amostras analisadas, independe se sua origem mostra que não é possível, através da metodologia de morfotipagem usada, distinguir os isolados entre os causadores de infecção ou não.⁽²⁷⁾ Em pesquisa realizada em Ribeirão Preto, SP, foi observada a predominância deste mesmo morfotipo, 534000, em *C. albicans* isoladas de próteses dentárias e saliva, o que sugere serem os microrganismos membros da microbiota humana.⁽¹¹⁾

Devido à grande diversidade de amostras analisadas, vários morfotipos em diferentes espécies foram identificados e em condições fisiológicas e sintomáticas diferentes.

Em leveduras isoladas, de secreção vaginal de mulheres não grávidas, com sintomas, foram identificados morfotipos únicos em *C. azyma* (URM 4979), *C. geochares* (URM 4985), *C. guilliermondii* (URM 4975), *C. salmanticensis* (URM 6088), *C. tropicalis* (URM 6090), *C. versatilis* (URM 4980), *R. pallida* (URM 4988), *R. rubra* (URM 6083) e *T. cutaneum* (URM 4973).

Em leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres não grávidas sem sintomas foram identificados também morfotipos únicos em *C. maritima* (URM 4976), *C. obtusa* (URM 4982) e *C. tropicalis* (URM 4989).

Os morfotipos únicos em leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas com sintomas foram identificados em *C. robusta* (URM 4972) e *C. tropicalis* (URM 6089).

A técnica de morfotipagem, além de utilizada para estudos epidemiológicos como possível marcador fenotípica, pode ser usada também como determinante de virulência, devido à presença de franjas descontínuas caracterizadas pelo primeiro dígito do sistema de tipagem.^(7,11)

Neste trabalho, dentre as leveduras isoladas de secreção vaginal, nenhuma amostra apresentou como primeiro dígito o morfotipo que contém o número "1". Essa característica representa, segundo o método proposto, a característica de franjas descontínuas em 20% da margem, o que sugere uma possível associação entre a presença de franjas descontínuas e maior virulência de amostras causadoras de infecção. As leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres com sintomas não apresentavam essa característica relacionada ao morfotipo que contém o número "1" para provocar os sinais e sintomas típicos da infecção vaginal.

Segundo o teste exato de Fischer, não se observou diferença significativa entre as espécies de leveduras em relação aos aspectos primários das franjas, apresentando características semelhantes. Porém, foi observada, em relação aos outros parâmetros, uma diferença entre leveduras da mesma espécie e semelhanças entre leveduras de espécies distintas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que, os morfotipos apresentam diferenças significativas independentes da espécie, presença ou ausência de sintomas, sendo importante para estudos epidemiológicos, terapêuticos e de variação morfológica.

Abstract

Aiming to characterize the yeasts isolated from vaginal secretion as an epidemiological tool to establish the identity and relation of species through the morphotyping, a total of thirty yeasts samples were used belonging to the genera Candida, Rhodotorula, Trichosporon and Kluyveromyces. The yeast suspension obtained from colonies grown on Sabouraud dextrose agar at room temperature (RT = 28°C ± 1°C) for 48 hours was standardized in the 3rd MacFarland scale. The suspension was sown in striations of approximately 5mm width and 25 mm length on the surface of plates containing malt agar maintained at room temperature for 10 days. Subsequently, macromorphological aspects of colonies were evaluated, as the presence of fringes and the characteristics of their surface, using the encoding according to the

typification model. The morphotyping allowed the identification of 17 different morphotypes, with the dominance of morphotypes 000000 and 524032. The results show that the morphotypes present significant differences regardless of species or the presence and absence of symptoms, being important for epidemiologicals, therapeutics and morphological variation studies.

Keywords

Yeasts; Vaginal secretion; Morphotyping

REFERÊNCIAS

- Giammanco GM, Lopes MM, Coimbra RS, Pignato S, Grimont PA, Grimont F, et al. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Aug;100(5):483-90.
- Phongpaichit S, Mackenzie DW, Fraser C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidemiol Infect*. 1987 Oct;99(2):421-8.
- Otero L, Vázquez F, Palacio V, Vázquez S, Carreño F, Méndez FJ. Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol*. 1995 Apr;11(2):221-4.
- Khan ZU1, Chandy R, Metwali KE. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. *Mycoses*. 2003 Dec;46 (11-12): 479-86.
- Liguori G, Marinelli A, Galdiero E, Arnese A, Di Onofrio V, Lucariello A, Marinelli P. *Candida* spp. Morphotype differentiation on Sabouraud-Triphenyltetrazolium-Agar (STTZ-Agar) under three different experimental conditions. *New Microbiol*. 2004 Apr; 27(2): 193-7.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Maria E, Heins V. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
- Hunter PR, Fraser CA, Mackenzie DW. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J Med Microbiol*. 1989 Feb;28(2):85-91.
- Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*. 1985 Nov 8;230 (4726): 666-9.
- Maffei CM, Paula CR, Mazzocato TS, Franceschini S. Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. *Mycopathologia*. 1997;137(2):87-94.
- O'Connell B, Coleman DC, Bennett D, Sullivan D, McCann SR, Keane CT. An epidemiological study of *Candida* species infection in cancer patients using genetic fingerprinting and morphotyping. *J Hosp Infect*. 1995 Nov;31(3):211-7.
- Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY, Fischman O, Zoror L. *Candida albicans* morphotypes from oral cavity in several families. *Biol Microbiol*. 1998;3:17-21.
- Silva MRR, Fernandes OFL, Costa MR, Costa TR, Gambale W, Paula CR. Biotype of *Candida albicans* isolates from AIDS patients. *Revis patol trop*, 31:195-202, 2002.
- Ribeiro EL, Silva MRR, Fernandes OFL, Silva SC, Soares AJ. Características fenotípicas de cepas de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase vaginal. *Revis patol trop*, 1998.
- Borromeo GL, McCullough MJ, Reade PC. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. *J Med Vet Mycol*. 1992;30(6):477-80.
- DK Kakru, MA Thoker, BA Mir Sofi. Correlation of morphotyping and extra cellular proteinase production as virulence markers in *Candida albicans*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 1999; 17(2):74-7.
- Ribeiro EL, Scroferneker ML, Cavalhaes MS. Aspectos fenotípicos de cepas de *Candida albicans* orais em crianças com síndrome de Down. *Braz. J. Biol*. 2006 Aug; 66,(3):939-44.

17. Franklin RB, Garland JL, Bolster CH, Mills AL. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Feb;67(2):702-12.
18. Lebaron P, Ghiglione JF, Fajon C, Batailler N, Normand P. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Mar 1;160(1):137-43.
19. Candido, R.C.; Azevedo, R.V.P.; Komesu, M.C.E. Enzyme typing of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000 Sep-Oct;33(5):437-42. [Article in Portuguese]
20. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses.* 1990 Jun;33(6):265-82.
21. Odds, F. C. *Candida and Candidosis.* 2a ed. Baviillière Tindall, London, 280p, 1998.
22. Pinto PM. Caracterização fenotípica e análise da variabilidade genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores e não portadores de doenças de base. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Instituto de Ciências da Universidade Federal de Minas Gerais, 148p, 2003.
23. Severo Gomes B, Lima AN, Neves RP, Magalhães OMC, Giampaoli V, Porto ALF, Queiroz L.A. Prospecção de leveduras em secreção vaginal e correlação com hemograma e dosagem de glicose. *RBAC.* 2010.42(1): 59-63.
24. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification.* 3ª ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000.
25. Kreger-Van RIJ, N. J. W. *The yeast: a taxonomic study.* 3ª ed. Elsevier Sci. Publication: Amsterdam, 1984.
26. Lodder, J. *The Yeast: a taxonomic study.* Oxford: North Holland Publishing Company, p 1385, 1970.
27. Lima TD, Fernandes OFL, Souza LKHS, Passos XS, Silva MRR. *Candida albicans* de mucosa vaginal: morfotipagem e produção de proteinase. *Revis patol trop.* 2004;33(1):65-70.

Correspondência

Bruno Severo Gomes

*Av. Engenheiro Domingos Ferreira, 4403 Aptº 702 – Boa Viagem
51020-040 – Recife, PE*

Tel.: (xx5581) 8837-4486, Fax: (xx5581) 2126-8482

E-mail: bseverogomes@gmail.com

A quantidade de material placentário para diagnóstico microbiológico de listeriose humana é o fator limitante no diagnóstico?

Is the placental material for human listeriosis microbiological diagnosis the limiting factor for diagnosis?

Ivânia Deliberalli¹

Virgínia Cunha-Schiavon¹

Franciele Souza-Masiero¹

Heitor Alberto Jannke^{2,3}

Alessandro Marques Santos⁴

Dulcinéa Blum-Menezes¹

Resumo

Listeriose feto-maternal resulta em abortamento precoce ou infecção generalizada em recém-nascidos. A maioria dos relatos de listeriose materno-fetal está relacionada a período gestacional não inferior à nona semana. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de cepas de *L. monocytogenes* em restos placentários provenientes de curetagem pós-abortamento, em tempo gestacional de até nove semanas. Foram realizadas análises microbiológicas e histológicas. Não foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* nos materiais coletados, embora achados histológicos de uma amostra revelou vilosidade placentária ocupada por grande número de leucócitos (vilosite), com distorção da arquitetura celular. A quantidade de amostra obtida para este tipo de análise geralmente é significativamente inferior à preconizada por protocolos descritos na literatura, o que pode restringir e limitar a acurácia do diagnóstico microbiológico.

Palavras-chave

Listeriose; Diagnóstico laboratorial

INTRODUÇÃO

Listerioses feto-maternal e neonatal resultam da invasão do feto via placenta, desenvolvendo o quadro de corioamnionite. As consequências são abortamento ou infecção generalizada em recém-nascidos, conhecida como granulomatose infantisséptica, caracterizada por presença de microabscessos piogranulomatosos disseminados pelo corpo, que acarretam em posterior óbito.⁽¹⁾

Apesar de a listeriose ser uma doença alimentar de baixa incidência comparada a outras doenças de origem alimentar, de acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), de Atlanta, EUA, estima-se que 2.500 pessoas (1/108.800 habitantes) são severamente acometidas por listeriose anualmente naquele país, e, destas, 500 evoluem para o óbito, salientando que, de acordo com a literatura, 27% destes casos são de gestantes.⁽²⁾

Em estudo realizado em Israel e descrito por Siegman-Igra e colaboradores,⁽³⁾ todos os casos perinatais de listerioses estavam relacionados a período gestacional igual ou acima da nona semana gestacional. O mesmo estudo apresenta uma revisão multicêntrica de casos de listeriose descritos na Inglaterra, Estados Unidos, Austrália e Espanha. Os 1.400 casos relacionados de listeriose perinatal, deste estudo, ocorreram em tempo gestacional de 9 a 29 semanas.⁽³⁾

Há relatos de isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos na região de Pelotas, RS,⁽⁴⁻⁶⁾ embora, pelo menos, nos últimos anos, não haja relatos de listeriose na região, segundo informações da Secretaria Municipal de Saúde daquele município.

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *L. monocytogenes* em restos placentários obtidos de material de curetagem pós-abortamento, em tempo gestacional de até nove semanas.

¹Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

²Disciplina de Patologia da Escola de Medicina da Universidade Católica de Pelotas, RS, Brasil.

³Laboratório de Patologia e Citopatologia LAPACIT - Pelotas, RS, Brasil.

⁴Hospital Universitário São Francisco de Paula, Faculdade de Enfermagem (Núcleo de Cirurgia), Universidade Católica de Pelotas, RS, Brasil.

Órgão de Fomento: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Projetos de Pesquisa para o Sul (PPSUS) - Edital 09 Processo 09/0061-3.

Artigo recebido em 17/05/2012

Artigo aprovado em 16/02/2016

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a busca ativa de restos placentários obtidos de procedimento de curetagem pós-curetagem de pacientes atendidas no Hospital Universitário São Francisco de Paula, Pelotas, RS, durante o período de 11 meses, a partir de fevereiro de 2010, e pacientes que voluntariamente aceitaram participar desta pesquisa.

As amostras foram coletadas assepticamente em sala cirúrgica. Os frascos contendo as amostras a serem analisadas foram armazenados a 4°C até serem encaminhadas ao Laboratório Genética de Microrganismos, Universidade Federal de Pelotas, RS.

Análise microbiológica

Para processamento microbiológico para pesquisa de *L. monocytogenes*, foi realizada a técnica segundo Kaur e colaboradores.⁽⁷⁾ Resumidamente, as amostras foram semeadas em *Pre-enrichment Broth* (PEB), *Tryptic Soy Broth*, com 0,6% de extrato de levedura e incubados à temperatura de 30°C, por um período de 24 horas. Para a fase de enriquecimento primário, alíquotas destas culturas foram transferidas para o meio UVM II (University of Vermont Medium II) preparado com *Listeria enrichment broth base* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e *Listeria Selective Enrichment Supplement I* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 30°C, por 24 horas. Para enriquecimento secundário, as culturas foram inoculadas em UVM II (University of Vermont Medium II) preparado com *Listeria Enrichment Broth Base* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e *Listeria Selective Enrichment Supplement II* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), e incubados a 30°C, por até cinco dias. Posteriormente, os inóculos foram semeados em três meios distintos: em *Oxoid Listeria agar base* (Himedia, Vadhani, Índia) suplementado com *Oxford Listeria Supplement* (Himedia, Vadhani, Índia), em *Oxoid Listeria agar base* (Himedia, Vadhani, Índia) suplementado com *Listeria Moxalactam Supplement* (Himedia, Vadhani, Índia) e em *agar Listeria* de Ottaviani & Agosti (ALOA, Laborclin, Paraná, Brasil) e incubados a 37°C, por 48 horas.

Análise histopatológica

As análises histopatológicas dos restos placentários foram realizadas através do método de rotina hematoxilina e eosina (HE), no Laboratório de Patologia e Citopatologia Lapacit - Pelotas, RS.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras clínicas de vinte pacientes. Foram coletados em média 7,5 g de restos placentários, com variação de 0,7 - 31,7 g.

Não foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* nos materiais coletados, embora análises histológicas de uma paciente revelou vilosidade placentária ocupada por grande número de leucócitos (vilosite), com distorção da arquitetura celular, que condiz com descritos na literatura em caso de processo infeccioso por *L. monocytogenes* (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Para o diagnóstico microbiológico de listeriose em processo de abortamento, é preconizada a quantidade de 25 g de restos placentários a serem inoculados na primeira etapa de cultivo em meio de pré-enriquecimento.⁽⁷⁾ Porém, em casos de aborto precoce até a nona semana de gestação, o volume de restos placentários obtidos para análises laboratoriais pode estar aquém do volume ideal para diagnóstico.

Há escasso material na literatura que relate a massa placentária em diferentes períodos gestacionais. Estima-se que o volume de placenta até o período gestacional de 12 semanas seja em torno de $52,07 \pm 17,25 \text{ mm}^3$,⁽⁸⁾ portanto, a estimativa da massa placentária seria de $41,66 \pm 13,80 \text{ g}$, considerando o cálculo que determina a massa placentária através da utilização de modelo matemático volumétrico considerando o coeficiente $r_s=0,80$.⁽⁹⁾

Para o período gestacional da nona semana, a literatura não apresenta valores volumétricos determinados, porém estes valores provavelmente sejam expressivamente menores.

Quanto ao processamento do material placentário para investigação laboratorial, é preciso considerar que porção significativa deste material é rotineiramente encaminhada para análises histopatológicas, o que reduz o volume de material a ser encaminhado para análises microbiológicas.

Desta forma, a quantidade de material obtido para investigação de listeriose em casos de abortamento precoce pode estar significativamente abaixo da preconizada na literatura, o que pode comprometer o diagnóstico desta infecção.

Uma amostra em nossa casuística apresentou achados histológicos que não descartam a possibilidade do abortamento ser um caso de listeriose feto-maternal. Na literatura, as alterações histológicas na placenta com listeriose são microabscessos, vilosite focal, corioamnionite e funiculite.⁽¹⁰⁻¹³⁾ Porém, não foi comprovada a presença do microrganismos na amostra enviada para análise microbiológica. A quantidade desta amostra enviada para análise foi 2,9 g, o que talvez tenha agregado menor sensibilidade à análise microbiológica.

CONCLUSÃO

O volume de restos placentários obtido para investigação microbiológica de agentes patogênicos relacionados a abortamentos precoces principalmente até a nona semana de gestação é, em muitos casos, significativamente abaixo da preconizada na literatura para isolamento de *L. monocytogenes*, o que pode limitar a acurácia do diagnóstico de listeriose humana dentro deste período gestacional.

Abstract

Feto-maternal listeriosis leads in early miscarriage or widespread infection in newborns. Most accounts of the maternal-fetal listeriosis usually are related to gestational period no less than ninth week. The aim of this study was to investigate the presence of L. monocytogenes strain in placental membranes from curetting after the abortion procedure up to 9 weeks of gestation. For this purpose microbiological and histological analyses were performed. L. monocytogenes strains were not isolated, although histological findings of a sample revealed a villous placenta occupied by large numbers of leukocytes (villitis), with distortion of cellular architecture. Amount of placental membrane forwarded to the microbiological analysis usually is less than proposed protocols which may restrict the microbiological diagnosis accuracy.

Keywords

Listeriosis; Laboratorial diagnosis

REFERÊNCIAS

1. Klatt EC, Pavlova Z, Teberg AJ, Yonekura ML. Epidemic neonatal listeriosis at autopsy. *Hum Pathol.* 1986 Dec;17(12):1278-81.
2. Mead PS, Dunne EF, Graves L, Wiedmann M, Patrick M, Hunter S, et al; Listeria Outbreak Working Group. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol Infect.* 2006 Aug;134(4):744-51.
3. Siegman-Igra Y1, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):305-10.
4. Nalério ES, Araújo MR, Mendonça KS, Bassani MT, Silva WP. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2009;29(3):626-30.
5. Silva WP, Lima AS, Gandra EA, Araújo MR, Macedo MRP, Duval EH. *Listeria* spp. no processamento de linguiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Cienc. Rural.* 2004;34(3):911-6.
6. von Laer AE, de Lima AS, Trindade Pdos S, Andriguetto C, Destro MT, da Silva WP- Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Braz J Microbiol.* 2009 Jul;40(3):574-82.
7. Kaur S, Malik SV, Vaidya VM, Barbuddhe SB - *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 2007 Nov;103(5):1889-96.
8. Hafner E, Metzenbauer M, Dillinger-Paller B, Hoefinger D, Schuchter K, Sommer-Wagner H, Philipp K. Correlation of first trimester placental volume and second trimester uterine artery Doppler flow. *Placenta.* 2001 Sep-Oct;22(8-9):729-34.
9. Azpurua H, Funai EF, Coraluzzi LM, Doherty LF, Sasson IE, Kliman M, Kliman HJ- Determination of placental weight using two-dimensional sonography and volumetric mathematic modeling. *Am J Perinatol.* 2010 Feb;27(2):151-5.
10. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 3a ed. New York: Springer-Verlag, 1995.
11. Fox H. Pathology of the placenta. *Clin Obstet Gynaecol.* 1986 Sep;13(3):501-19.
12. Schwab JP, Edelweiss MIA. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica. *J Brás Patol Med Lab.* 2003;39(2):111-4.
13. Weis J, Seeliger HPR. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol.* 1975 Jul;30(1):29-32.

Correspondência

Dulcinea Blum-Menezes

Universidade Federal de Pelotas – Campus Capão do Leão

Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Instituto de Biologia

Caixa Postal 354 – CEP 96001-970 – Pelotas, RS

Fone: (53) 3275-7621

E-mail dulcinea.blum@ufpel.edu.br



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trail Number [SRCTN], Netherlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaiosclnicos.gov.br>) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz]

é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/ abstract.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tif" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, esteja familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title Incluir versão em Português
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title Incluir versão em Português
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Summary Incluir versão em Português
Palavras-Chaves <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords Incluir versão em Português
Introdução	Introduction
Material e Métodos	Material and Methods
Ética	Ethics
Resultados	Results
Discussão	Discussion
Conclusão	Conclusion
Conflito de interesse	Conflicts of Interests
Suporte Financeiro	Funding Sources
Agradecimentos	Acknowledgements
Referências	References

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

TÍTULO CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.
AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [Medical Subject Headings], elaborado pelo NLM [National Library of Medicine]. Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas

de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou ".tif" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato ".tif". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urm_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine]* (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética. Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chamada Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula "e" entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome deverá ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como "de" ou "da";
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofes ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
- Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

- **Um/dois autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji⁽²⁸⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea wernickii*, em homenagem a Parreiras Horta.
- **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.⁽³²⁾ também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

- **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabtes,⁽¹⁷⁾ os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

- **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,⁽⁵⁾ a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

- **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.⁽¹⁴⁾

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.
- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec*. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

- **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidiodomycosis. *Clin Dermatol*. 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. *Singapore Med J*. 2012 Sep;53(9):604-7.
- **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. *Intern Med*. 2012;51(20):2967-71.
- **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-*

Cryptococcus gattii Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control*. 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int*. 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger*. 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettner M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics*. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

• **Um autor/ mais de um autor:** Stockham SL, Scott MA. Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. Bases da parasitologia médica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Pentead MV. *Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Responsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. *Ética em pesquisa: temas globais*. Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de *Candida* isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Relatório de atividades: 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. Diário Oficial da União 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias:** Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. Diário Oficial da União 13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niêro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgr/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **Sistema de Gestão de Publicações (SGP)**, no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de *login* e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concorrência e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.