

## PESQUISA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA FIBROSE CÍSTICA E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS MUCÓIDES

### CYSTIC FIBROSIS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RESEARCH AND CHARACTERIZATION OF MUCÓIDE STRAINS

Fernanda Biscoto Nebes<sup>1</sup>  
Jannaina Ferreira de Melo Vasco<sup>2</sup>  
Janaina de Rezende<sup>3</sup>  
Cintia Regina Felix de Oliveira<sup>4</sup>

Recebido em 09 de janeiro de 2016  
Aceito em 23 de fevereiro de 2016

#### RESUMO

A Fibrose Cística é uma doença crônica, progressiva e multissistêmica. Portadores apresentam alterações em um gene *CFTR*, cuja fisiopatologia está associada ao acometimento do sistema respiratório e gastrointestinal, levando a infecções progressivas e crônicas. Pacientes fibrocísticos têm maior susceptibilidade à colonização e infecções por patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, a infecção por esse micro-organismo varia de acordo com a idade do paciente, tendo essa bactéria um aparecimento mais tardio. O presente trabalho teve como objetivo analisar, em amostras de escarro e *swab* de orofaringe, a presença do patógeno identificando sua característica morfotintorial, colonial e presença de cepas com fenótipo mucóide (MUC). Foram analisadas cinquenta e duas amostras de pacientes diagnosticados com Fibrose Cística atendidos no Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas do Paraná-UFPR. As cepas de *P. aeruginosa* foram analisadas e identificadas através de características coloniais, morfotintoriais, provas bioquímicas e presença de cepas com fenótipo MUC utilizando técnicas microbiológicas padrões. Entre as 52 amostras analisadas apenas 42 (81%) obtiveram crescimento. A partir das amostras analisadas apenas 5 (12%) apresentaram característica mucóide. No teste de susceptibilidade aos antibióticos 48% foram sensíveis, 19% apresentaram resistência intermediária e 33% foram resistentes aos antibióticos amicacina, aztreonan, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, levofloxacino, tozobactan, tobramicina. Devido à importância desta doença o diagnóstico é fundamental, quando colonizados por *P. aeruginosa*, que apresentam a alteração da cepa com fenótipo MUC, sendo de difícil erradicação. Com isso uma melhor capacitação profissional e identificação microbiológica, proporcionar um diagnóstico correto, é de muita importância, para uma melhor sobrevida ao paciente fibrocístico.

**DESCRITORES:** *Pseudomonas aeruginosa*; Fibrose Cística; Fenótipo de Cepas Mucóides.

#### ABSTRACT

Cystic fibrosis is a chronic, progressive and multisystem disease. Patients have changes in a *CFTR* gene, whose pathophysiology is associated with involvement of the respiratory and gastrointestinal system, leading to progressive and chronic infections. Cystic fibrosis patients is more susceptible to colonization and infection by pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, infection by that pathogen varies with the age of the patient, this bacterium having a more delayed appearance. This study aimed to analyze in the oropharynx sputum samples the presence of the pathogen different morphotypes identifying their characteristics, colonial and the presence of strains with mucoid phenotype (MUC). Fifty-two samples from patients diagnosed with Cystic Fibrosis of Ambulatory Cystic Fibrosis of Clinical Hospital of Parana-UFPR were analyzed. The strains of *P. aeruginosa* were analyzed and identified by colonial features, morphotintorial, biochemical tests and the presence of strains with phenotype MUC using microbiological techniques standards. Among the 52 samples analyzed only 42 (81%) achieved growth. From the samples analyzed only 5 (12%) showed characteristic mucóide. In susceptibility testing to antibiotics were 48% sensitive, 19% had intermediate resistance and 33% were resistant to antibiotics, amikacin, aztreonan, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, tozobactan, tobramycin Because of the importance of this disease diagnosis is critical when colonized by *P. aeruginosa*, which represent the change in strain with phenotype MUC, being difficult to eradicate. Thus a better job training and microbiological identification provide a correct diagnosis is very important for improved survival to the Cystic Fibrosis patient.

**KEYWORDS:** *Pseudomonas aeruginosa*; Cystic Fibrosis; Mucoid Strains.

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário Autônomo do Brasil- UNIBRASIL. <sup>2</sup>Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Coordenadora do curso de Biomedicina do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL. Endereço para correspondência: Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, Curitiba- PR. CEP: 82821-020. Email: [jannainavasco@gmail.com](mailto:jannainavasco@gmail.com) <sup>3</sup>Biomédica. Formada no Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL. Especialista em Microbiologia pela PUC-PR. <sup>4</sup>Fisioterapeuta. Mestre em Medicina Interna pela UFPR.

## INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística, também conhecida como mucoviscidose, foi identificada há mais de 70 anos<sup>(1)</sup>. É caracterizada como doença genética autossômica recessiva, e atinge ambos os gêneros, sendo mais frequente na população euro-descendente, e raramente acomete a população afrodescendente. É uma doença crônica, progressiva e multissistêmica<sup>(2)</sup>.

Foi considerada inicialmente como uma doença exclusiva do grupo pediátrico, devido ao seu diagnóstico precoce e medidas terapêuticas mais efetivas, para o seu controle; porém, a Fibrose Cística vem sendo, cada vez mais, referida em adolescentes e adultos jovens<sup>(3)</sup>. De acordo com dados do Registro da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) a mediana de sobrevivência no ano de 2008 a 2012 foi de 37,8 anos<sup>(4)</sup>.

A prevalência de Fibrose Cística no mundo é de cerca de 70.000 crianças e adultos<sup>(5)</sup>. Na população euro-descendente situa-se entre 1: 2.500 a 1: 3.200 nascidos vivos, e na população afrodescendente 1: 17.000 nascidos vivos<sup>(6)</sup>. No Brasil, em diferentes estados foi descrita a incidência da doença, no Paraná 1: 8.000 nascidos vivos, Santa Catarina 1:6.000 nascidos vivos, Minas Gerais 1:10.000<sup>(1)</sup>. Em média, na população euro-descendente, a cada 25 pessoas 1 é portadora de alterações no gene *CFTR*<sup>(7)</sup>. Este gene quando mutado codifica uma proteína anormal *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulation*)<sup>(3)</sup>, que constitui um canal de cloretos na membrana apical de células epiteliais exócrinas<sup>(13)</sup>. Esta proteína controla o fluxo de íons na membrana celular, como cloro (Cl<sup>-</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>) e água<sup>(3)</sup>.

A disfunção da proteína *CFTR* resulta em uma doença sistêmica, que acomete diversos órgãos do corpo apresentando sinais e sintomas variados, manifestando-se, preferencialmente, no sistema respiratório e gastrointestinal<sup>(5)</sup>. Ocorre a produção de muco espesso e desidratado nos epitélios respiratórios e secreções viscosas quando se tem alteração na homeostasia, isso leva a uma obstrução nos ductos das glândulas exócrinas e influencia o aparecimento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), níveis elevados de eletrólitos no suor, insuficiência pancreática com má digestão/má absorção e consequente desnutrição secundária<sup>(1,2)</sup>.

Portadores da mutação no gene *CFTR* nascem com a estrutura pulmonar normal, mas com o passar do tempo desenvolvem doença respiratória progressiva com infecções crônicas, ocasionando a formação de bronquiectasias, sendo a insuficiência respiratória a principal causa de óbito<sup>(8)</sup>.

Na insuficiência pancreática, a obstrução dos canalículos pancreáticos por mucos viscosos impede a liberação de enzimas para o duodeno, determinando a má digestão de

carboidratos, proteínas e gorduras. O resultado é a má absorção de nutrientes não hidrolisados no lúmen pela secreção pancreática, decorrente da disfunção pré-epitelial gerada <sup>(2)</sup>.

No trato respiratório devido à obstrução dos ductos, pacientes fibrocísticos têm maior susceptibilidade à colonização e infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. A infecção por esse patógeno varia de acordo com o estado clínico do paciente, condições ambientais, exposições a outros fibrocísticos e idade do paciente. Diferente de outros patógenos, sua prevalência varia com a idade e tende a aparecer mais tardiamente <sup>(8)</sup>.

Micro-organismos como *Pseudomonas* spp. são encontrados no solo, água, em matéria orgânica e na vegetação. Também pode ser encontrado no ambiente hospitalar, em reservatórios úmidos. São bacilos gram-negativos, com flagelos que lhes confere movimento, são não-fermentadores da glicose, e aeróbios obrigatórios, embora possam crescer anaerobicamente, utilizando nitrato ou arginina como acceptor alternativo de elétrons. Apresentam resistência a muitos antibióticos e podem sofrer mutações para cepas mais resistentes durante o tratamento <sup>(9)</sup>. Este patógeno é responsável por cerca de 80% das infecções crônicas, que infecta as vias aéreas em fibrocísticos e está relacionado com a diminuição da função pulmonar e insuficiência respiratória <sup>(10)</sup>.

Devido à cronicidade da doença, as cepas sofrem alteração fenotípica, causada pela produção excessiva do alginato polissacarídeo extracelular, resultando em uma cepa com fenótipo mucóide (MUC) <sup>(10)</sup>. Esse fenótipo está relacionado com dificuldade de erradicação do patógeno, levando à resposta inflamatória e provocando aceleração da perda funcional, o que dificulta o estado clínico dos pacientes <sup>(8)</sup>.

A produção dessa cápsula polissacarídica, também conhecida como exopolissacarídeo mucóide, protege o micro-organismo da fagocitose e da atividade de antibióticos como os aminoglicosídeos. O gene que controla a produção desse polissacarídeo pode ser encontrado frequentemente em pacientes com Fibrose Cística, que estão predispostos à colonização de cepas com fenótipo MUC de *P. aeruginosa* por longos períodos. Na clínica essas cepas com fenótipo MUC isoladas desses pacientes são difíceis de erradicar com antibioticoterapia <sup>(9)</sup>.

Há uma grande importância no diagnóstico do micro-organismo *P. aeruginosa* na Fibrose Cística, colonização esta que deve ser diagnosticada logo nos primeiros anos de vida, com início imediato de seu tratamento e de acompanhamento constante. Considerando que pacientes fibrocísticos, portadores deste patógeno oportunista, apresentam alta taxa de mortalidade devido à cronicidade da doença. Tendo em vista o exposto, este trabalho teve como objetivo analisar a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de escarro e de orofaringe de pacientes fibrocísticos, identificando suas características morfológicas,

coloniais, perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de cepas com fenótipos MUC.

## **METODOLOGIA**

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR, sob parecer nº 2290.184/2010-07 (Anexo1).

Trinta e nove pacientes na faixa etária entre 4 meses a 53 anos fizeram parte deste estudo. Todos os pacientes são diagnosticados com Fibrose Cística e acompanhados no Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas – UFPR, no período de março de 2013 a dezembro de 2013.

Os pais ou responsáveis pelos pacientes menores de 16 anos e o próprio paciente quando maior de 16 anos tomaram conhecimento dos objetivos e procedimentos que foram realizados, e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Pacientes entre 12 e 16 anos assinaram também o termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) (Anexo 3). Como critério de inclusão, as amostras a serem analisadas foram de pacientes diagnosticados com Fibrose Cística, ambos os gêneros, que aceitaram e assinaram os termos, e que fizeram acompanhamento no ambulatório de Fibrose Cística. Como critério de exclusão, amostras em que não tenham sido isoladas o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* e pacientes que não aceitaram participar do estudo.

A identificação e estudo do micro-organismo foram realizados no laboratório de Microbiologia Clínica do UNIBRASIL. Para a identificação de *P. aeruginosa*, foi utilizado isolado de bactérias previamente identificadas pelo setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas - UFPR, como parte de atendimento do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas - UFPR. As amostras coletadas foram de escarro e de *swab* de orofaringe, durante o período de março a dezembro de 2013. As bactérias isoladas dessas amostras foram transportadas em meio de cultura sólido (ágar) em tubo para o laboratório de Microbiologia Clínica do UNIBRASIL. Então, foram semeadas em meio de cultura ágar sangue para verificação da pureza e congeladas em solução BHI líquido com glicerol a 10% para análises posteriores, em temperatura entre -18°C a -20°C. Para o início das análises, as cepas foram retiradas do congelamento e semeadas em caldo BHI sem glicerol por 24 horas a 35±2°C e em seguida ressemeadas em ágar sangue. A partir do crescimento nesse ágar foi analisado o resultado de hemólise, pureza da cultura e então semeadas em ágar MacConkey (MC) por 18 a 24 horas a 35 ± 2°C (para caracterização colonial). Após o crescimento em MC foi repicado

uma colônia em ágar cetrimide (seletivo para o crescimento de *Pseudomonas spp*) e incubada por 18 a 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . A partir do MC foram realizadas as provas bioquímicas como OF glicose, citocromo-oxidase, motilidade, redução de nitrato a nitrito, OF lactose, OF maltose e OF xilose, gelatina e crescimento em caldo simples BHI a  $42^\circ\text{C}$  <sup>(11)</sup>. Além disso, foi realizado identificação morfotintorial através da coloração de Gram.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *P. aeruginosa* foi feito no LACEN (Laboratório Central do Paraná), pela técnica de disco-difusão de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI,2003).

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: amicacina (AK), aztreonan (ATM), colistina (CT), cefepima (FEP), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEM), imipenem (IPM), levofloxacino (LEV), meropenem (MEM), (piperacilina/tozobactan (TZP) e tobramicina (TOB).<sup>(12)</sup>

Com o auxílio de uma alça bacteriológica 1/100, foram transferidos de 3 a 4 colônias e inoculadas em 3 a 4 mL de solução fisiologia 0,9%, comparado com a escala padrão de 0,5 de McFarland. Com um *swab* semeou-se em ágar Muller-Hinton em três direções diferentes, até distribuição uniforme do inóculo. Deixou-se secar em temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente aplicaram-se os discos de antibiótico. Após a aplicação dos discos de antibiótico, incubaram-se as placas em estufa por 18 a 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente, realizada a leitura das placas, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano e interpretada segundo as normas do CLSI, descrevendo como resistente intermediário ou sensível diante cada antibiograma testado.

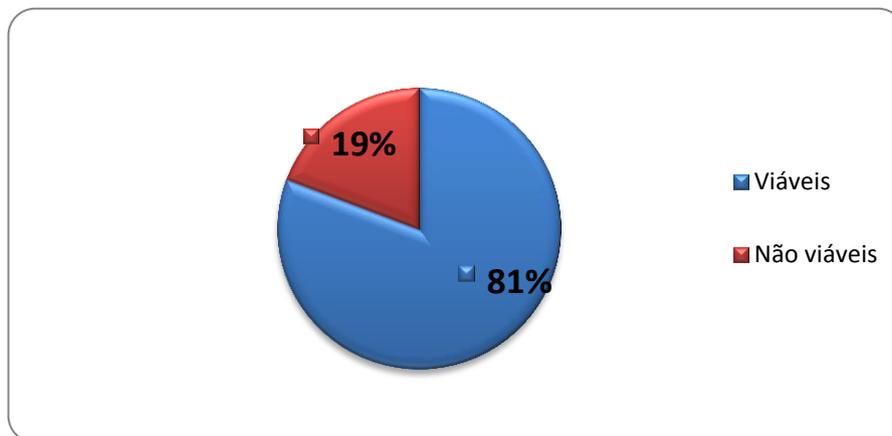
Os métodos foram realizados para a identificação do micro-organismo a ser pesquisado. A partir dos resultados obtidos em provas bioquímicas e antibiograma, pode ser confirmada resistência ou sensibilidade aos antibióticos e a presença de cepas com fenótipo MUC. Os resultados foram analisados por métodos estatísticos convencionais através de gráficos e tabelas, com auxílio do programa Excel.

## RESULTADOS

Entre as 52 cepas isoladas das amostras de escarro e de orofaringe, recebidos do Hospital de Clínicas do Paraná, provindos de 39 pacientes diagnosticados com Fibrose Cística, 42 (81%) estavam viáveis, apresentando crescimento nos meios de cultura e foram identificadas como *P. aeruginosa* (figura1). As cepas isoladas foram submetidas à avaliação

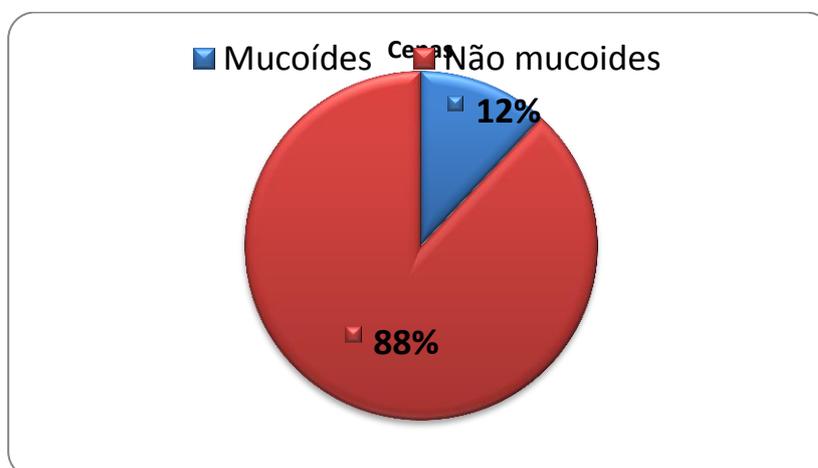
colonial e provas bioquímicas para a identificação e confirmação do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa*.

**FIGURA 1- Representação do crescimento de *P. aeruginosa***



Todos os isolados, quando inoculados em ágar sangue, apresentaram hemólise do tipo  $\beta$ - hemólise (hemólise total), e, como característica colonial, brilho metálico, colônias com bordas irregulares e odor adocicado, característicos de cepas de *P. aeruginosa* que em ágar MC apresentaram-se características colônias semelhantes porém, com cor verde amarronzado e resultado de lactose negativo. Nesse ágar foi também possível a diferenciação das cepas com fenótipos MUC, ou seja, produz um expolissacarídeo mucóide. Das cepas incluídas no estudo, 12% apresentaram característica MUC e 88% não MUC (figura 2), essa característica MUC foi encontrada no presente estudo em pacientes maiores de dez anos (tabela 1). O crescimento em ágar cetrimide foi característico mostrando pigmentação típica de *P. aeruginosa* (coloração esverdeada de piocianina).

**FIGURA 2- Representação cepas com fenótipo mucóide.**

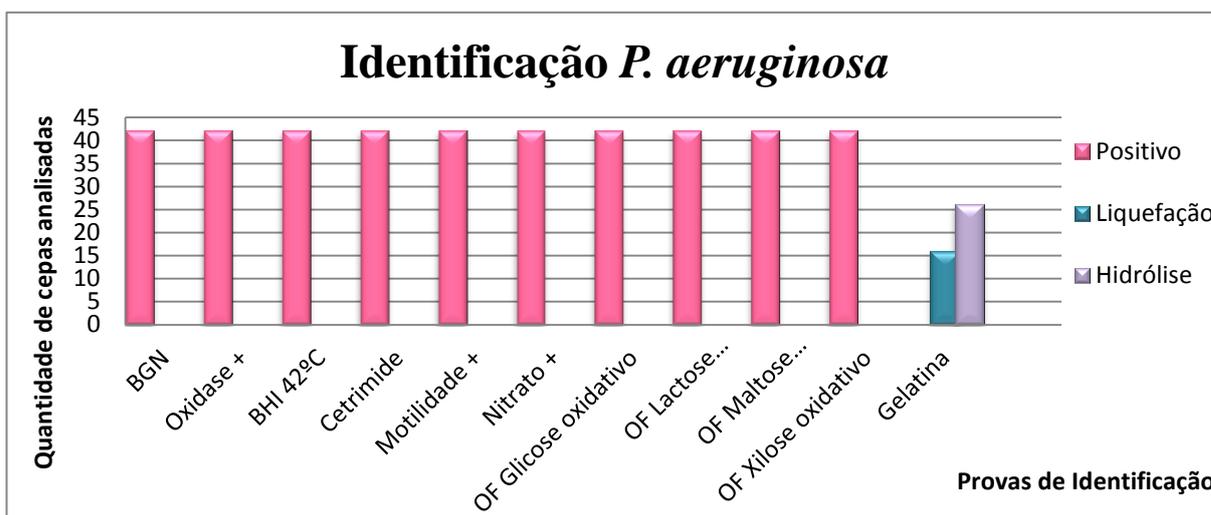


**Tabela 1. Frequência de pacientes fibrocísticos em relação à faixa etária.**

	Cepa <i>P. aeruginosa</i> não mucóide	Cepa <i>P. aeruginosa</i> com fenótipo mucóide
4 meses a 1 ano	21,5%	0
1 ano a 10 anos	40,4%	0
> 10 anos	26,1%	12%

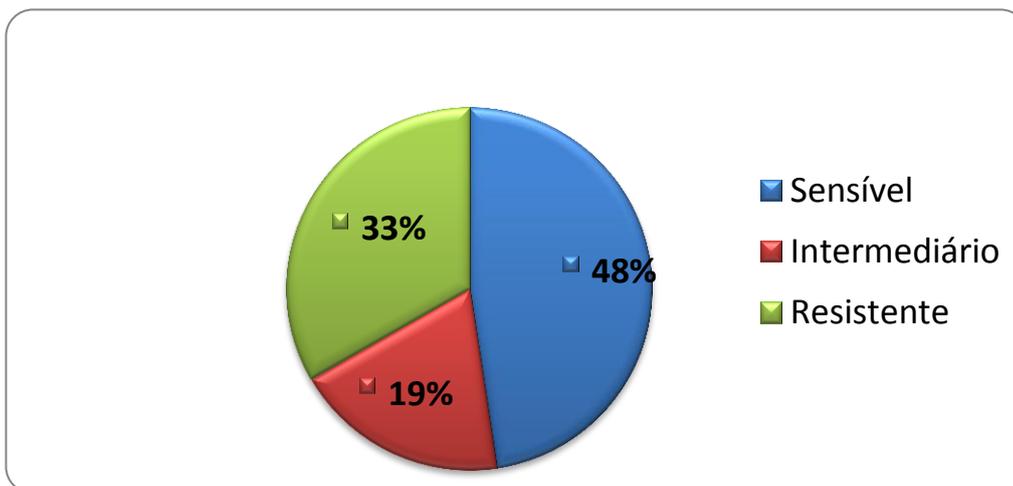
A identificação fenotípica das cepas foi confirmada através da coloração de Gram, revelando bacilos gram-negativos e provas bioquímicas convencionais como oxidase (+), crescimento BHI a 42° C (+), Motilidade (+), redução de nitrato a nitrito (+), OF glicose oxidativo (com e sem vaselina), OF lactose, xilose e maltose oxidativo e liquefação e hidrólise da gelatina (Figura 3).

**FIGURA 3- Prova de Identificação *Pseudomonas aeruginosa***



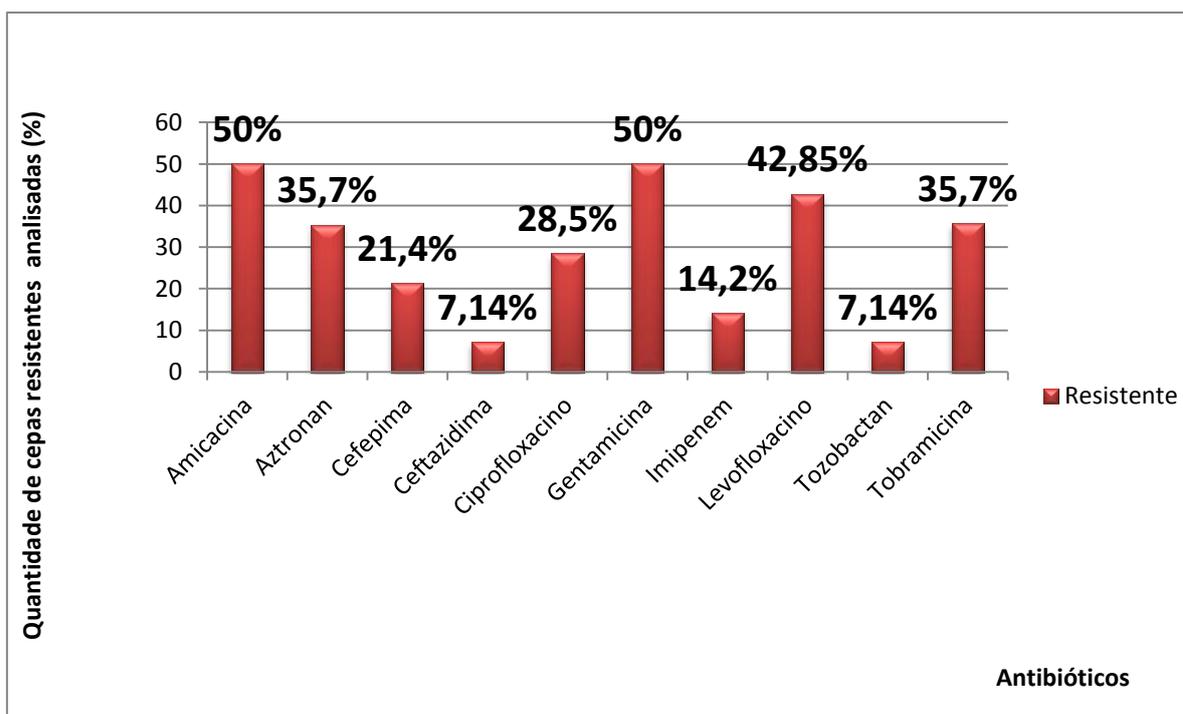
O perfil de sensibilidade de cada antibiótico foi analisado, sendo que dos 42 isolados pesquisados, 20 (48%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados, 8 (19%) apresentaram resistência intermediária ao aztreonam (ATM), cefepime (FEP), ciprofloxacino (CIP), imipenem (IPM), piperacilina/ tozobactan (TZP) e 14 (33%) são resistentes a pelo menos um antibiótico testado (Figura 4).

**FIGURA 4- Perfil geral de susceptibilidade aos antibióticos.**



Entre as 14 (33%) cepas que apresentaram resistência aos antibióticos, 50% apresentaram resistência a amicacina e gentamicina, 42,85 % levofloxacino, 35,7% aztronan e tobramicina, 28,5 % ciprofloxacino, 21,4% cefepima, 14,2% impenem, ceftazidima e 7,14% piperacilina/ tozobactan, como pode ser visto na figura 5. Os antibióticos colistina e meropenem apresentaram 100% de sensibilidade.

**FIGURA 5- Percentual de Resistência aos antibióticos**



## DISCUSSÃO

Como descrito, a Fibrose Cística é uma doença genética de caráter autossômico recessivo, sendo mais comum em populações euro-descendentes. Seu diagnóstico é sugerido pelas características clínicas de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), colonização pulmonar persistente, íleo meconial, insuficiência pancreática com prejuízo do desenvolvimento ou história familiar da doença. Na presença dessas, seu diagnóstico é confirmado através da concentração de cloro no suor e pela mutação nos cromossomos.<sup>(14)</sup>

*P. aeruginosa* é considerado o principal patógeno responsável por danos pulmonares, colonizando de 70% a 90 % dos pacientes fibrocísticos com o aumento da idade. Segundo o estudo de Gaspar *et al*, quando há colonização pulmonar por *P. aeruginosa* existe uma maior frequência de perda de peso nos pacientes, ocasionando em desnutrição.<sup>(15)</sup>

Segundo o estudo de Reis *et al*, este micro-organismo tem sido o mais importante do trato respiratório de pacientes fibrocísticos, com taxas de colonização que variam de 50 a 70%, em diferentes centros de tratamento. Embora pacientes possam ser colonizados logo nos primeiros anos de vida, o micro-organismo não acaba sendo comumente isolado, do trato respiratório, até a infância tardia e início da adolescência, seguindo a colonização por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenza*. Esses achados são consistentes com dados de Toronto nos quais 12% das crianças com Fibrose Cística foram colonizadas antes de um ano de vida e 44% estavam colonizadas aos sete anos, mas se diferem dos dados referidos na Dinamarca, nos quais menos de 10% estavam colonizadas, aos cinco anos, e 50%, aos 10 anos. No presente estudo 21,5 % dos pacientes foram colonizados antes de um ano de vida, 40,4 % colonizados entre um ano a dez anos de vida, e 38,1% foram colonizados após os dez anos.<sup>(14)</sup>

No presente estudo foram analisadas 42 amostras de *swab* de orofaringe e escarro, embora a cultura de espécimes faríngeos seja recomendada como uma alternativa à cultura para os fibrocísticos incapazes de fornecer escarro, alguns estudos comparativos mostram que os espécimes faríngeos são inferiores ao escarro ou lavado bronco-alveolar no diagnóstico bacteriológico, neste estudo a acurácia de culturas de *swab* de orofaringe e escarro não foi possível, já que não foi submetido ao paciente a coleta de duas amostras diferentes, devido às amostras serem predeterminadas no local de coleta<sup>(16)</sup>.

Com esse trabalho, conclui-se para os laboratórios que não dispõem de metodologia molecular para a identificação de isolados de *P. aeruginosa*, um bom desempenho do

esquema de identificação fenotípica empregado, sendo capaz de determinar o gênero e a espécie do patógeno em estudo. Em concordância com o trabalho de Magalhães *et al.*<sup>(16)</sup>.

O fenótipo MUC apareceu em 5/42 (12%) das cepas analisadas, apresentando-se em pacientes maiores de dez anos. A incidência do micro-organismo aumenta, conforme a idade, e 70 a 90% dos pacientes são, eventualmente, infectados. O tempo da infecção crônica por *P. aeruginosa* varia muito em cada paciente. Alguns toleram o patógeno por 15 a 20 anos com um pequeno declínio da função pulmonar, já outros, a função pulmonar piora rapidamente. As cepas não mucóides frequentemente são encontradas no início da colonização em pacientes fibrocísticos, ao se tornar crônica, as cepas com fenótipo MUC a substituem, o que está de acordo com investigações “*in vitro*”, as quais demonstraram que cepas não mucóides aderem em maior quantidade às células epiteliais bucais do que as cepas com fenótipo mucóide<sup>(14)</sup>.

Este micro-organismo possui uma grande habilidade para uma alteração fenotípica e genotípica que permite a sua manutenção e adaptação dentro do pulmão dos pacientes com Fibrose Cística para o estabelecimento da infecção crônica. Dentre as características de adaptação, se destaca o fenótipo mucóide, conseqüente à hiperprodução de um polissacarídeo denominado alginato, um polímero de ácido D-manurônico e ácido L-glicurônico. Uma vez estabelecida a infecção pelo fenótipo MUC, é praticamente impossível sua erradicação<sup>(17)</sup>. Tem sido demonstrado que a superprodução de alginato confere uma vantagem de sobrevivência seletiva para *P. aeruginosa* com fenótipo MUC em relação a não MUC<sup>(18)</sup>. O encontro desse fenótipo confere vantagens para *P. aeruginosa*, como a sua associação com a formação de biofilmes. O biofilme é um conjunto de bactérias estruturadas e embebidas em uma matriz polimérica autoproduzida constituída de uma matriz polimérica, proteína e DNA. Nos pulmões dos pacientes com Fibrose Cística, o alginato é a parte principal da matriz do biofilme. As bactérias envolvidas no biofilme estão associadas à infecção crônica não só pela sua resistência aos componentes do sistema imune, mas também devido a sua tolerância aos antibióticos<sup>(17)</sup>.

Estudos realizados na região nordeste do Brasil, a bactéria mais frequente encontrada em paciente portador de Fibrose Cística foi *P. aeruginosa*, onde foram obtidos 96 espécimes (65,3%). Entre esses isolados, 57 (59,3%) foram de variedade mucóide. Em 12 espécimes ambos os fenótipos, mucóide e não mucóide, foram analisados<sup>(16)</sup>. Em outro estudo realizado no nordeste do Brasil, foram analisadas 53 amostras de *P. aeruginosa*, 18 (33,96%) apresentaram o fenótipo MUC e 35 (66,04%) apresentaram fenótipo não mucóide<sup>(18)</sup>. O fenótipo dessas cepas indica que uma mesma cepa de *P. aeruginosa* pode persistir em um paciente, mas pode se diferenciar. Porém, cepas não mucóides são frequentemente

encontradas no início da colonização, e, ao tornarem-se crônicas, as cepas com fenótipo MUC a substituem<sup>(14)</sup>.

A antibioticoterapia pode melhorar o estado clínico e reduzir a concentração bacteriana, mas a erradicação de *P. aeruginosa* nas infecções aéreas dos pacientes com Fibrose Cística geralmente é falha. Isto pode ser justificado pelo fato de o antibiótico ser capaz de produzir um alívio assintomático por eliminação da população selvagem, mas, como o biofilme não é eliminado, uma nova exacerbação pode ocorrer quando o antibiótico é removido. O estudo de Marques demonstrou que de 40 cepas de *P. aeruginosa* obtida de 20 pacientes com infecção crônica atendidos em dois centros de referência do Rio de Janeiro, foram avaliadas para a concentração inibitória mínima (CIM) de cepas em estado selvagem e em condições de crescimento em biofilme (concentração inibitória de biofilme –BIC) frente a cinco antimicrobianos (amicacina, gentamicina, tobramicina, ceftazidima e ciprofloxacino). Todas as amostras testadas para a susceptibilidade em estado de biofilme (BIC) foram mais resistentes quando comparadas ao mesmo isolado testado no estado selvagem. Esses resultados indicam que os regimes correntes de antimicrobianos baseados nos testes de susceptibilidade padrão podem resultar em concentrações subótimas dos antibióticos e podem ser um dos fatores relacionados à falha no tratamento<sup>(17)</sup>.

Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são betalactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina, com atividade bactericida no tratamento de infecções provocadas por isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*. Possuem considerável estabilidade diante da maioria das betalactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL); por essa razão, os carbapenêmicos são considerados os antibióticos de reserva, empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos demais betalactâmicos ou a outros antibacterianos. Com o aumento da frequência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, a indústria farmacêutica não tem lançado alternativa terapêutica com um espectro de atividade similar ou superior ao imipenem, o atual prognóstico de bactérias multirresistentes acabada sendo desfavorável. Com isso, a antibioticoterapia restringe-se a alternativas terapêuticas com antibióticos considerados inadequados devido à sua alta toxicidade, como, por exemplo, as polimixinas (Colistina). Essa perda de sensibilidade ao imipenem pode ser decorrente da perda de porinas, presença de proteínas de ligação às penicilinas com baixa afinidade por carbapenêmicos, superexpressão de bombas de efluxo ou hidrólise enzimática<sup>(19)</sup>.

Entre os mecanismos responsáveis pela resistência ao imipenem, a impermeabilidade da membrana, devido à perda de porinas ou à superexpressão das bombas de efluxo, confere

uma resistência adicional a várias classes de antibióticos como resultado de um efeito cascata geradas por múltiplos mecanismos de resistência inter-relacionados <sup>(19)</sup>.

Em concordância com os estudos de Figueiredo *et al*, todas as amostras avaliadas no estudo foram sensíveis à polimixina (Colistina). Entre as 20/42 (48%) das amostras analisadas apresentaram sensibilidade, principalmente amicacina, piperaciclina-tozobactam, imipenem e meropenem, que os torna boa escolha de tratamento para as infecções <sup>(20)</sup>.

Nos últimos anos a Fibrose Cística vem sendo reconhecida como a mais importante doença hereditária, sendo uma doença de fácil colonização por bactérias multirresistentes, como *P. aeruginosa*, um importante patógeno devido à alteração do fenótipo MUC que algumas cepas apresentam. Existe uma grande importância de se conhecer e relatar o fenótipo MUC (figura 6) devido às complicações que permanecem no paciente, e a sua difícil erradicação com antibioticoterapia. Com essa complexidade do diagnóstico da Fibrose Cística e em conjunto o diagnóstico microbiológico, é imprescindível que tenham profissionais capacitados e atualizados, bem como os laboratórios que realizam os testes microbiológicos como, por exemplo, identificação do patógenos e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA), fazem com que leve aos possíveis tratamentos que o paciente fibrocístico pode ter, um erro nesses testes pode diminuir a sua sobrevivida.

### FIGURA 6 – Fenótipo mucóide (MUC) de *P. aeruginosa*



(Foto: Nebes, F.)

### REFERÊNCIAS

1. SILVA FA; DALCIN PTR. **Fibrose cística- Uma Introdução. Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre. v. 31. p.121-122. 2011

2. ROSA FR, DIAS FG, NOBRE LN, MORAIS HA. **Fibrose cística: Uma abordagem clínica e nutricional.** Rev Nutr. 2008;21(6):725–37.
3. TARANTINO AB. **Doenças Pulmonares.** 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1067p.
4. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry. Annual Data Report 2012.
5. FIRMIDA, MC; LOPES, AJ. **Aspectos Epidemiológicos da Fibrose Cística.** Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ. Rio de Janeiro. v. 10. p.12-22. Out/Dez 2011.
6. BARRETO SSM. **Pneumologia: no consultório.** 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 776p.
7. RUBIN E. **Patologia: Bases clinicopatológicas da medicina.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1625p
8. FILHO LVRFS, FERREIRA FA, REIS FJC, BRITTO MCA, LEVY CE, CLARK O, et al. ***Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnostics, and treatment.** J Bras Pneumol.2013; 39 (4)
9. MURRAY PR. et al. **Microbiologia Médica.** 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2004. 762p
10. RYALL, BEN. et al. **O Switch Mucoïd in *Pseudomonas aeruginosa* Represses Quorum Sensing Systems and Leads to Complex Changes to Stationary Phase Virulence Factor Regulation.** PLoS One.May. 2014.
11. KONEMAN EW. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido.** 6º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.
12. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada-** Oitava Edição. NCCLS. Publicação M2-A8,2003
13. DALCIN PDTR, ABREU E SILVA FA DE. **Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects.** J Bras Pneumol publicação Of da Soc Bras Pneumol e Tisiologia .2008;34(2):107–17.
14. REIS FJC, DAMACENO N. **Fibrose cística.** J Pediatr (Rio J). 1998;74(1):76–94

15. GASPAR MC A, CHIBA SM, GOMES CET, JULIANO Y, NOVO NF, ANCONA-LOPEZ F. **Resultado de intervenção nutricional em crianças e adolescentes com fibrose cística.** J Pediatr (Rio J). 2002;78(2):161–70.
16. MAGALHÃES M, BRITTO MC A DE, BEZERRA PGM, VERAS A. **Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórios de fibrocísticos do Recife.** J Bras Patol e Med Lab. 2004;40(4):223–7
17. MARQUES E A. **Perfil Microbiológico na Fibrose Cística.** Rev HUPE. 2011;10(4):23–35.
18. ALVES LR, AMÉLIA M, MACIEL V. **Análise Microbiológica e Molecular de Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes do Hospital das Clínicas do Recife- Pernambuco.** 2008;2–5
19. NEVES PR, MAMIZUKA EM, LEVY CE, LINCOPAN N. ***Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil.** J Bras Patol e Med Lab. 2011;47:409–20.
20. FIGUEIREDO, D. Q. et al. **Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.** J Bras Patol Med Lab. 2009;45(3):177–84.