

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA AQUINO

**ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS
PÓS-INFECÇÕES VIRAIS**

**Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Minas Gerais
2012**

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA AQUINO

**ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS PÓS-
INFECÇÕES VIRAIS**

Monografia apresentada ao III Curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do certificado de Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador(a): Prof. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

**Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Minas Gerais
2012**



FOLHA DE APROVAÇÃO

“ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS PÓS
INFECÇÕES VIRAIS”

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA AQUINO

Monografia apresentada e aprovada em 10/05/2012 pela Comissão
Examinadora constituída pelos seguintes membros:

Lirlândia Pires de Sousa

Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa (Orientadora)

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Fac. Farmácia –
UFMG

Raquel Virginia Rocha Vilela

Raquel Virginia Rocha Vilela (Examinadora)

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Fac. Farmácia –
UFMG

Aos meus amados pais Maria Edna e Valnísio, pelo amor incondicional, pelo carinho e dedicação. Ao meu irmão Rodrigo e ao meu grande amor Alex.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha força em todos os momentos.

Aos meus amados pais Maria Edna e Valnísio, pelo apoio, incentivo e amor incondicional em todos os momentos.

À professora Lirlândia Pires de Sousa pelo apoio e dedicação com que me orientou, tornando possível a realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos de caminhada.

RESUMO

A pneumonia é um distúrbio infeccioso e inflamatório que se instala nos pulmões e é causada pela penetração de agentes infecciosos ou irritantes no espaço alveolar. O aparelho respiratório possui mecanismos de defesas tais como ações mecânicas e resposta imunológica que garantem a esterilidade das vias aéreas inferiores, impedindo a invasão bacteriana. Quando esses mecanismos não são eficientes o hospedeiro não consegue conter a agressão bacteriana e ocorre instalação da doença. Alguns fatores favorecem o aparecimento de pneumonia como envelhecimento, tabagismo, insuficiência cardíaca, colonização da orofaringe, micro e macroaspiração, alcoolismo, imunodepressão e as infecções virais. Pacientes com sistema imune debilitado por infecções virais são mais predispostos a sofrerem infecções bacterianas secundárias. A infecção viral provoca a destruição celular e a descamação da mucosa superficial das vias respiratórias, aumentam a suscetibilidade dos pacientes à superinfecção bacteriana pela perda do processo de depuração ciliar, à disfunção das células fagocíticas o que diminui a efetividade de limpeza do trato respiratório. O principal microrganismo causador de pneumonia bacteriana é o *Streptococcus pneumoniae* sendo o responsável por 20 a 60% dos casos de pneumonia bacteriana na comunidade. O desafio do diagnóstico é a identificação do patógeno, o que faz com que, na maioria das vezes, o diagnóstico se baseie somente no diagnóstico clínico fazendo com que a terapia antimicrobiana não seja muitas vezes a ideal. O diagnóstico microbiológico é fundamental para a identificação do patógeno e a conduta correta para o tratamento. As características que permitem a identificação do *S. pneumoniae* são: alfa hemólise em Agar sangue, sensibilidade à optoquina e bili solubilidade. Além da identificação do patógeno é imperativo que seja realizado o antibiograma para identificação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Pneumonia – infecção viral – vírus Influenza – *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRACT

Pneumonia is an infectious and inflammatory disorder that settles in the lungs and is caused by the penetration of infectious agents or irritants in the alveolar space. The respiratory system has defense mechanisms such as immune response and mechanical actions to ensure the sterility of the lower airways, preventing bacterial invasion. When these mechanisms are not efficient host cannot contain the bacterial invasion occurs and onset of the disease. Some factors favor the occurrence of pneumonia as aging, smoking, heart failure, oropharyngeal colonization, micro and macroaspiration, alcoholism, immunosuppression, and viral infections. Patients with weakened immune system by viral infections are more likely to suffer secondary bacterial infection. The viral infection causes cell destruction and sloughing of superficial tissues of the respiratory system, increase susceptibility to bacterial superinfection of patients for the loss of ciliary clearance process, the dysfunction of phagocytic cells which reduces the effectiveness of cleansing the respiratory tract. The main causative organism of bacterial pneumonia is *Streptococcus pneumoniae* is responsible for 20-60% of cases of bacterial pneumonia in the community. The challenge is the diagnostic identification of the pathogen, which causes, in most cases, the diagnosis is based only in clinical diagnosis making the antimicrobial therapy is often not optimal. The microbiological diagnosis is essential to identify the pathogen and the correct conduct for treatment. The characteristics that allow identification of *S. pneumoniae* are alpha hemolysis on blood agar, optochin sensitivity, and Bili solubility. Besides the identification of the pathogen is imperative that it be carried out to identify the antibiotic susceptibility profile to antimicrobials.

Keywords: Pneumonia - viral infection - influenza virus - *Streptococcus pneumoniae*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Radiografia do tórax de um paciente com pneumonia pneumocócica, mostrando opacidade no lóbulo inferior e lobo médio.....23
- FIGURA 2** - Coloração de Gram realizada em amostra de escarro mostrando morfologia típica de *Streptococcus pneumoniae*.....29
- FIGURA 3** - Cultura de *Streptococcus pneumoniae* em Agar sangue.....30
- FIGURA 4** - Testes utilizados na identificação de *S. pneumoniae*. Teste de catalase, sensibilidade à optoquina e bile solubilidade.....33

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	10
2 -	PNEUMONIA BACTERIANA.....	11
2.2 -	Fatores de risco para o estabelecimento das pneumonias.....	11
2.2.1 -	<i>Envelhecimento</i>	11
2.2.1.1 -	<u>Micro e macroaspiração</u>	12
2.2.2 -	<i>Tabagismo</i>	12
2.2.3 -	<i>Insuficiência cardíaca</i>	13
2.2.4 -	<i>Colonização da orofaringe</i>	13
2.2.5 -	<i>Alcoolismo</i>	13
2.2.6 -	<i>Imunossupressão</i>	14
2.2.7 -	<i>Infecções virais</i>	14
2.3 -	Os pulmões.....	14
2.3.1 -	<i>Mecanismo de defesa pulmonar</i>	15
2.4 -	Infecção pulmonar.....	16
2.5 -	Principais micro-organismos causadores de pneumonia.....	17
2.5.1 -	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
3 -	O VÍRUS INFLUENZA.....	19
3.1 -	Patogenia e instalação do vírus.....	20
3.2 -	Infecção viral como fator de predisposição às infecções bacterianas.....	21
4 -	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS..	22
4.1 -	Diagnóstico clínico.....	22
4.2 -	Radiografia do tórax.....	22
4.3 -	Diagnóstico laboratorial.....	23
4.3.1 -	<i>Proteína C reativa</i>	23
4.3.2 -	<i>Interleucina6</i>	24
4.3.3 -	<i>Procalcitonina</i>	24
4.4 -	Diagnóstico microbiológico.....	24
4.4.1 -	<i>Espécimes clínicos utilizados para o diagnóstico</i>	24
4.4.1.1 -	<u>Escarro</u>	24
4.4.1.2 -	<u>Lavado broncoalveolar</u>	25
4.4.1.3 -	<u>Escovado broncoalveolar</u>	26
4.4.1.4 -	<u>Aspirado de secreção traqueal</u>	26
4.4.1.5 -	<u>Biópsias</u>	27
4.4.1.5.1 -	Biópsia pulmonar a céu aberto.....	27
4.4.1.5.2 -	Biópsia transbrônquica.....	27
4.4.1.5.3 -	Punção pulmonar.....	27

4.5 -	Isolamento e identificação bacteriana.....	27
4.5.1 -	<i>Coloração de Gram</i>	28
4.5.2 -	<i>Culturas</i>	29
4.5.3 -	<i>Semeadura e isolamento de colônias</i>	30
4.5.3.1 -	<u>Ágar chocolate</u>	31
4.5.3.2 -	<u>Ágar sangue</u>	31
4.6 -	Identificação de bactérias.....	31
4.6.1 -	<i>Teste da catalase</i>	32
4.6.2 -	<i>Prova da optoquina</i>	32
4.6.3 -	<i>Teste de solubilidade em bile</i>	32
4.7 -	Antibiograma.....	34
5 -	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 - INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas representam uma causa importante de morbidade e mortalidade no mundo (RODRIGUES *et al.*, 2002). As pneumonias são um grave problema de saúde pública, em função de sua grande incidência. Compreendem um grupo de enfermidades que são a terceira causa de mortalidade relacionada com infecções; essas doenças são responsáveis por 4% a 15% das mortes registradas no mundo (CORREA, 1998).

Cerca de 30 a 60% das pneumonias adquiridas na comunidade não revelam nenhum agente entre os mais frequentemente pesquisados e isoladas, ficando apenas com diagnóstico clínico ou de imagem (ANVISA, 2004).

A pneumonia é um processo infeccioso e inflamatório que se instala nos pulmões e é causada pela agressão de micro-organismos que podem acometer a região dos alvéolos pulmonares onde desembocam as ramificações terminais dos brônquios e, às vezes, os septos alveolares (espaços entre um alvéolo e outro). Basicamente, as pneumonias têm como principais agentes infecciosos ou irritantes (bactérias, vírus, fungos e alérgenos) no espaço alveolar, por via aérea e menos frequentemente pelas vias hematogênica e linfática (MURRAY, 2010).

Os micro-organismos causadores das pneumonias são transmitidos de pessoa a pessoa a partir de secreções respiratórias contaminadas ou por micro aspiração de germes que colonizam a orofaringe do próprio indivíduo (RODRIGUES *et al.*, 2002).

A orofaringe tem uma microbiota mista com grande variedade de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, incluindo *Streptococcus* alfa hemolíticos e não hemolíticos, *Streptococcus* beta hemolíticos não pertencentes ao grupo A, *Neisserias* não patogênicas, *Haemophilus* spp., difteróides, *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp.. Alguns patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, enterobactérias e leveduras como *Candida albicans* podem ser componentes transitórios da microbiota da orofaringe em indivíduos saudáveis, sem desenvolvimento de doença.

O trato respiratório abaixo da laringe não possui microbiota residente normal (ANVISA, 2004).

2 - PNEUMONIA BACTERIANA

A pneumonia de origem bacteriana ocorre quando os mecanismos de defesa do hospedeiro não consegue conter uma agressão bacteriana aos pulmões. As bactérias podem ser de origem endógena ou exógena, sendo introduzidas no pulmão por microaspiração, inalação, fluxo sanguíneo ou extensão direta. A corrente sanguínea pode transportar micro-organismos para o pulmão, onde podem produzir a pneumonia, entretanto o local de origem da infecção e os efeitos da sepse geralmente superam a importância da pneumonia resultante (MANDELL, 2009).

Os micro-organismos presentes no ar são altamente selecionados pelas condições ambientais, tendo que vencer as condições naturais como a irradiação ultravioleta, ao ressecamento e às mudanças de temperaturas. E apenas aqueles micro-organismos capazes de provocar infecção com um inóculo muito pequeno, podem causar doença por via aérea, pois, são inalados poucos micro-organismos a cada respiração. Os micro-organismos transmissíveis pelo ar frequentemente provocam surtos de infecção quando grupos suscetíveis são expostos (MANDEL, 2009).

O diagnóstico das pneumonias é realizado através de sinais e sintomas clínicos que se caracterizam por: mal estar, febre, dor torácica, tosse produtiva ou não, falta de ar e dor na expansão torácica (MURRAY, 2010); através de exames radiológicos do tórax que são essenciais para o diagnóstico, avaliação da gravidade e detecção de complicações da pneumonia (CORREA, 1998); e pelo diagnóstico microbiológico que é fundamental para o cultivo e identificação do patógeno e avaliação da suscetibilidade do patógeno aos diversos antimicrobianos, contribuindo para a decisão terapêutica correta (RODRIGUES *et al.*, 2002).

2.2 - Fatores de risco para o estabelecimento de pneumonias

2.2.1– *Envelhecimento*

A idade não é um fator de risco independente para pneumonia, exceto para

idosos acima de 65 anos e com doença crônica. É provável que a idade e a enfermidade, sejam associadas ao mal prognóstico da pneumonia (GOMES, 2001).

As alterações dos mecanismos de defesa do idoso, sejam mecânicas ou pela debilidade do sistema imune, podem influenciar negativamente nas defesas do hospedeiro. A diminuição gradativa do timo pode ter papel importante no desenvolvimento da imunodeficiência característica do idoso (GOMES, 2001).

As células T do idoso têm deficiência em ativar e proliferar em resposta a um antígeno. A habilidade das células T para secretar interleucina-2 (IL-2) para o recrutamento de outras células T diminui com a idade, o recrutamento de macrófagos por células T, os neutrófilos polimorfonucleares e a fagocitose podem também estar diminuídos. As alterações mecânicas como o aumento dos espaços aéreos pulmonares, a perda da viscosidade dos pulmões, a alteração no reflexo de tosse e a diminuição do *clearancemucociliar*, que é a primeira linha de defesa das vias aéreas contra elementos inalados, já que permite a apreensão e eliminação dos mesmos sem que entrem em contato direto com a célula do epitélio, podem alterar as defesas do hospedeiro (GOMES, 2001).

2.2.1.1 - Micro e macroaspiração

A aspiração de secreções contaminadas da orofaringe que colonizam as vias áreas superiores são uma via comum de inoculação pulmonar (CUNHA, 2010).

O envelhecimento pode causar disfunção da orofaringe e juntamente com o aumento da carga de micro-organismos presentes, a aspiração torna-se um perigo maior para os idosos. Quando ocorre colonização do trato respiratório superior, as aspirações de orofaringe são o degrau inicial para as infecções inferiores. A aspiração de pequenas quantidades de secreções orofaríngeas ocorre em 50% dos indivíduos normais enquanto dormem. Como a concentração bacteriana das secreções da orofaringe é alta, na ordem de 10^{8-10} organismos por ml, a aspiração de pequena quantidade pode dar um grande inóculo para o pulmão, iniciando uma pneumonia. (GOMES, 2001).

2.2.2 - Tabagismo

O tabagismo é um importante fator de risco para pneumonia por alterar as defesas locais pulmonares como o *clearancemucociliar*, alteração do sistema imune e as funções inflamatórias. O tabagismo é o fator de risco mais importante para DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e ambos, DPOC e tabagismo são fatores predisponentes para pneumonia (GOMES, 2001).

2.2.3 - Insuficiência cardíaca

Pneumonia está frequentemente associada à insuficiência cardíaca sendo que, o aumento do fluido alveolar pulmonar e alterações de mecanismo de defesa locais levam a este risco aumentado. A insuficiência cardíaca tem grande impacto de saúde pública por ser comum entre idosos e aumentar em duas vezes mais o risco de morte relacionado à pneumonia (RODRIGUES *et al.*, 2002).

2.2.4 - Colonização da Orofaringe

A colonização da orofaringe é um ponto inicial importante no aparecimento de muitas pneumonias. A má higiene oral está associada ao aumento da microbiota anaeróbica. A colonização da orofaringe pelo *Streptococcus pneumoniae*, que é o mais prevalente agente etiológico, ocorre pela ligação das bactérias por adesinas de superfície epiteliais. A migração das bactérias, para o trato respiratório inferior pode ser evitada quando elas são cercadas de muco e eliminadas pela ação de células do sistema mucociliar (MURRAY, 2010).

2.2.5 - Alcoolismo

O uso excessivo de álcool afeta os sistemas respiratório e imune e seu consumo está associado com o aumento da colonização da cavidade oral por microbiota gram-negativa, incluindo depressão dos reflexos de glote e da tosse, assim como a ação ciliar, risco de alteração da consciência e de convulsões; e vômitos com aspiração. O

número de granulócitos e linfócitos podem estar diminuídos com o consumo de álcool, afetando a defesa no sítio da infecção (GOMES, 2001).

2.2.6– Imunodepressão

A pneumonia pode ocorrer em indivíduos saudáveis como também secundariamente a uma enfermidade predisponente (CUNHA, 2010).

Nas últimas décadas o número de imunocomprometidos têm aumentado na comunidade através da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplantes, imunossuppressores, sendo estes pacientes mais vulneráveis a infecções secundárias, principalmente respiratórias das quais a pneumonia representam a forma mais grave e frequente. A pneumonia pode ocorrer em até 80% dos casos de leucemia aguda e em 20% dos pacientes transplantados. A lesão pulmonar que ocorre em hospedeiros imunocomprometidos pode ser causada por doença infecciosa em função da imunodepressão ou pela própria doença de base (CORREA, 1998).

2.2.7 - Infecções Virais

Os pacientes imunocomprometidos ou em recuperação de alguma infecção viral são bastante suscetíveis a infecções bacterianas habituais e oportunistas que podem ser causadas por microrganismo com pouca virulência para hospedeiros normais (JAWETZ *et al.*, 2000).

As infecções virais principalmente ocasionadas pelo vírus influenza podem causar danos ao epitélio pulmonar, trazendo uma maior exposição dos sítios de ligação necessários para a ligação das bactérias podendo causar pneumonias bacterianas secundária a infecção viral (MAEDA; NORONHA, 2010).

2.3 - Os pulmões

Os pulmões são dois órgãos localizados no interior da cavidade torácica, revestidos externamente por uma membrana denominada pleura. A pleura reveste a

cavidade torácica internamente (pleura parietal) e os pulmões externamente (pleura visceral). Tais membranas são contínuas no hilo do pulmão. Entre elas, existe um espaço virtual denominado de espaço pleural. Nesse espaço existe pequena quantidade de líquido pleural que diminui o atrito durante os movimentos pulmonares, podendo estar aumentando em condições patológicas (CUNHA, 2010).

Os pulmões apresentam forma cônica, com ápice, base, faces (costal, mediastinal, diafragmática e interlobar) e margens (anterior, posterior e inferior), sendo septados em lobos pelas fissuras. Este par de órgãos está apoiado sobre o diafragma, protegidos pelas costelas e ficam separados um do outro em grande parte, pelo coração (área cardíaca). O pulmão direito apresenta-se dividido em três lobos (superior, médio e inferior) por duas fissuras interlobares presentes na superfície. Já o pulmão esquerdo está dividido em dois lobos (superior e inferior). Os lobos, por sua vez, apresentam-se divididos em segmentos broncopulmonares, conforme a ramificação dos brônquios. O segmento broncopulmonar pode ser definido como sendo a porção do pulmão onde determinado brânquio se distribui (CUNHA, 2010).

2.3.1 - Mecanismo de defesa pulmonar

O aparelho respiratório possui mecanismos de defesas tais como ações mecânicas e resposta imunológica que garantem a esterilidade das vias aéreas inferiores, impedindo a invasão bacteriana. A primeira barreira é formada por pelo sistema mucociliar, um sistema que consiste nas células de revestimento das vias aéreas, nas células secretoras e nas secreções. O batimento dos cílios impulsiona as secreções em direção à boca (MANDELL, 2009). As bactérias que penetram as vias aéreas ou nos alvéolos são destruídas no local por células fagocíticas (MANDELL, 2009). Esta ação é completada pela atividade de granulócitos e polimorfonucleares, do sistema do complemento e da imunidade específica humoral e celular (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Os macrófagos alveolares que residem nos pulmões conseguem fagocitar e destruir um número muito grande de bactérias não patogênicas sem desencadear uma resposta inflamatória. Para as bactérias patogênicas, algumas espécies imediatamente induzem o recrutamento de neutrófilos e a destruição bacteriana parece depender mais da disponibilidade de neutrófilos do que da presença de macrófagos alveolares. A

eliminação desses micro-organismos do pulmão é intensificada pela presença de anticorpos específicos. A imunoglobulina IgG é a imunoglobulina predominante no alvéolo (MANDELL, 2009).

Se persistirem bactérias viáveis, inicia-se rapidamente uma resposta inflamatória, caracterizada por edema intersticial e alveolar, assim como influxo de neutrófilos. As substâncias quimioatraentes responsáveis pela migração dos neutrófilos incluem várias moléculas C5a, interleucinas 8 e 12 (IL-8, IL-12), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon- γ e diversas quimiocinas. Contrário aos mediadores pró inflamatórios, existem várias moléculas que inibem alguns aspectos da resposta inflamatória, como IL-10, que desativa os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos, mas por outro lado contribuem para resolução do processo inflamatório. À medida que os neutrófilos e as bactérias se acumulam o meio torna-se ácido e hipóxico, e tanto a fagocitose quanto a destruição das bactérias ficam retardadas (MANDELL, 2009).

A disseminação do edema e da inflamação na periferia da lesão continua até o aparecimento de anticorpos específicos (cinco a sete dias) ou a instituição de antibioticoterapia específica e efetiva (MANDELL, 2009).

2.4 - Infecção pulmonar

Os micro-organismos têm acesso ao trato respiratório inferior através da inalação de partículas ou pela aspiração da microbiota normal do trato respiratório superior (MURRAY, 2010).

Para que a infecção ocorra é necessário que exista uma baixa defesa do indivíduo, um inóculo suficiente para alcançar o trato respiratório e que o micro-organismo seja virulento (ANVISA, 2010).

A aspiração de secreções orofaríngeas constitui uma via comum de inoculação pulmonar. As bactérias aspiradas nas secreções orofaríngeas colonizam o trato respiratório primariamente ao aderir a receptores seletivos de superfície celular, que só ligam determinadas espécies de bactérias às células da mucosa. Esses determinantes da microbiota residente podem incluir micro-organismos patogênicos, mesmo em indivíduos normais (MANDELL, 2009).

A natureza química dos receptores de diferentes espécies de bactérias é muito variável e o local do receptor pode ser parte integrante da superfície celular ou estar presente em proteínas fixadas à célula. A disponibilidade de receptores epiteliais e a suscetibilidade à colonização variam de acordo com a doença de base, a terapia antimicrobiana ou a existência de infecções virais concomitantes (MANDELL, 2009).

Os indivíduos saudáveis são susceptíveis a infecção por uma gama de patógenos que possuem adesinas, que permite que o patógeno se prenda especificamente ao epitélio respiratório (MURRAY, 2010).

Alguns indivíduos mais propensos à aquisição de pneumonias que outros. O alcoolismo, o tabagismo, a insuficiência cardíaca e a doença pulmonar obstrutiva crônica são causas que predispõem à pneumonia. As crianças e os idosos correm maior risco de a contraírem, assim como os indivíduos com um sistema imune deficiente. Também estão no grupo de risco indivíduos debilitados, prostradas na cama, paralisadas ou inconscientes ou as que sofrem de uma doença que afeta o sistema imunitário, como a AIDS (CUNHA, 2010).

2.5 - Principais micro-organismos causadores de pneumonias

Uma grande variedade de micro-organismos pode causar pneumonia. A maior parte das pneumonias da infância tem como causa principal a infecção por vírus ou bactérias que invadem a trato respiratório após uma infecção viral. As causas de pneumonias em adultos dependem de vários fatores de risco como idade, doenças subjacentes e exposição aos patógenos. Em geral pode ser difícil distinguir clinicamente entre pneumonias virais e bacterianas (MURRAY, 2010).

As pneumonias virais podem ser causadas por grande quantidade de vírus dependendo das defesas do hospedeiro. A maioria dos vírus tem moléculas de superfície que aderem especificamente ao epitélio respiratório de indivíduos comprometido, mas também de indivíduos saudáveis. O vírus respiratório sincicial (VRS) mesmo não causando pneumonia pode danificar as defesas respiratórias, abrindo caminho para as pneumonias bacterianas secundárias (CUNHA, 2010).

Os agentes mais isolados em pneumonias da comunidade são: *Streptococcus pneumoniae* com uma prevalência de 20 a 60%; *Haemophilus influenzae* 3 a 10%; *Staphylococcus aureus* 3 a 5 %; Anaeróbios da cavidade oral 6 a 10%; *Moraxella*

catarrhalis 1 a 3%; *Chlamydia pneumoniae* 5 a 17%; *Legionellapneumophila* 2 a 8%, vírus respiratórios 2 a 15% (ANVISA, 2010).

Grandes variações ocorrem em diferentes populações e outros fatores epidemiológicos (época do ano, surtos, faixa etária, etc.). Nas crianças a distribuição tem particularidades marcantes com diferentes faixas etárias em função da experiência imunológica com os potenciais agentes infecciosos, o que reduziu a freqüência nas comunidades vacinadas (GOMES, 2001; ANVISA, 2010).

2.5.1 –*Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae* são os principais agentes etiológicos de infecções respiratórias adquiridas na comunidade (CUNHA, 2010). São diplococos Gram positivos que fazem parte da microbiota normal da orofaringe, capazes de se espalhar pelos pulmões e podem ser transportados pelo sangue para outras regiões do organismo e colonizar outros órgãos (MURRAY, 2010). O *S. pneumoniae* também pode ser transmitido de pessoa a pessoa podendo resultar em surtos esporádicos (CUNHA, 2010).

O *S. pneumoniae* são cocos Gram positivos dispostos aos pares e em pequenas cadeias, tem formato oval ou lanceolados com 0,5 a 1,2 µm. é um microrganismo fastidioso que cresce somente em meios de cultura ricos. São catalase negativo, sensíveis a optoquina e sofrem bile solubilidade. O *S. pneumoniae* possui uma cápsula polissacarídica que lhe permite resistir à fagocitose. A virulência do *S. pneumoniae* está relacionada à presença da cápsula polissacarídica que oferece proteção contra a atividade fagocitária. Cepas encapsuladas podem produzir doença, já as cepas não capsuladas não são virulentas (MURRAY, 2010).

Pacientes com sistema imune debilitado por infecções virais são mais predispostos a sofrerem infecção bacterianas secundárias. As infecções virais principalmente causadas pelo vírus influenza podem causar danos ao epitélio pulmonar e propiciar a instalação de pneumonias bacterianas (MAEDA; NORONHA, 2010).

3 - O VÍRUS INFLUENZA

O vírus influenza faz parte da família *Orthomyxoviridae*. O termo “myxovirus” refere-se a sua afinidade pelo muco e são divididos em três gêneros A, B e C em função da antigenicidade de suas proteínas. Os três gêneros podem ser diferenciados através das proteínas de matriz, seqüência codificadora de nucleoproteínas e pela antigenicidade que possuem (MARTINEZ, 2009).

O vírus da influenza A é subdividido com base em seus dois antígenos de superfície, a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). Já foram identificadas 16 tipos de H (H1-H16). E nove tipos de N (N1 – N9). Todos os tipos já foram isolados em aves que são hospedeiros naturais (GARCIA, 2009). As três cepas do vírus influenza tipo A que freqüentemente afetam o homem são H1N1, H2N2, H3N2 e o H5N1 que foi isolado em humanos em 1998 e em 2003 em Hong Kong (GOMES, 2001).

O genoma é um filamento de RNA segmentado e estes segmentos podem ser reagrupados durante a replicação dos vírus podendo dar origem a novas combinações de antígenos, sofrendo alterações genéticas ao se disseminarem em várias espécies de hospedeiros (MURRAY, 2010).

As partículas do vírus da influenza são geralmente esféricas com cerca de 100nm de diâmetro. Os genomas de RNA de filamento único dos vírus influenza A e B ocorrem em forma de oito segmentos separados. Os vírus da influenza C contém nove proteínas estruturais diferentes. A nucleoproteína NP associa-se ao RNA viral, formando uma estrutura de ribonucleoproteína (RNP) de 9nm de diâmetro. Três proteínas grandes (PB1, PB2 e PA) estão ligadas a RNP viral e são responsáveis pela transcrição e replicação do RNA. A proteína da matriz (M1) que forma uma camada sob o envoltório lipídico viral e é importante na formação morfológica das partículas (JAWTEZ *et al.*, 2000).

A partícula viral é circundada por um envoltório lipídico e duas glicoproteínas codificadas pelo vírus são inseridas neste envoltório, a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N) (GOMES, 2001).

As glicoproteínas de superfície constituem antígenos importantes que determinam a variação antigênica do vírus da influenza (JAWTEZ *et al.*, 2000). As diferenças antigênicas, expressas pelas proteínas estruturais internas (NP) e a proteínas da matriz (M) são utilizadas para dividir os vírus da influenza em três tipos A, B e C. A proteína H do vírus influenza é de extrema importância biológica, pois liga as

partículas virais às células suscetíveis e constituem o principal antígeno do vírus. Sua grande variabilidade constitui o fator responsável pela continuação de novas cepas. (MURRAY, 2010; JAWTEZ *et al.*, 2000).

Cada partícula viral possui aproximadamente 500 antígenos de superfície H e cerca de 100 antígenos de superfície N. As hemaglutininas se ligam as células do hospedeiro e fundem o envelope viral com a membrana plasmática da célula para desencadear infecção (MURRAY, 2010).

A neuraminidase atua no final do ciclo de vida do vírus onde libera a carga viral na superfície da célula e ajuda o vírus a atravessar a camada de muco nas vias respiratórias para alcançar o alvo que são as células epiteliais (JAWTEZ *et al.*, 2000).

3.1 -Patogenia e instalação do vírus

As células do epitélio respiratório podem ser infectadas se as partículas virais não forem removidas pelo reflexo da tosse e se conseguirem escapar da neutralização de anticorpos IgA específicos já circulantes. A instalação e propagação do vírus é rápida e logo se difunde por células adjacentes onde o ciclo de replicação se repete (MURRAY, 2010).

Os sintomas iniciais da influenza ocorrem através de lesão direta pelo vírus e respostas inflamatórias associadas. O vírus penetra no trato respiratório através de gotículas e fixa aos receptores ácidos siálicos nas células epiteliais através da glicoproteína H do envelope viral. A proteína N viral reduz a viscosidade do muco das vias respiratórias deixando os receptores de superfície celular expostos e promovendo a disseminação dos vírus para o trato inferior. Em pouco tempo muitas células estão infectadas e possivelmente destruídas (JAWTEZ *et al.*, 2000).

Com a infecção ocorre a elevação das citocinas pró-inflamatórias como o interferon- α , IL-6 e TNF- α no sangue e secreções respiratórias e provavelmente contribuem para os efeitos sistêmicos como febre (HAYDEN, 2009).

O período de incubação desde o momento da exposição ao vírus até o aparecimento do sintoma pode variar de 1 a 4 dias, dependendo do tamanho da carga viral e do estado imunológico do hospedeiro (HAYDEN, 2009).

A infecção pelo vírus influenza provoca destruição celular e descamação da mucosa superficial das vias respiratórias, mas não afetam a camada basal do epitélio.

A lesão do epitélio respiratório pelo vírus reduz a resistência a invasores bacterianos secundários, principalmente estafilococos, estreptococos e *Haemophilus influenzae* (JAWTEZ *et al.*, 2000).

3.1.1 -Infecção viral como fator de predisposição às infecções bacterianas

As infecções pelo vírus influenza provocam a destruição celular e a descamação da mucosa superficial das vias respiratórias. Além disso, aumentam a suscetibilidade dos pacientes a superinfecção bacteriana, devido à perda do processo de depuração ciliar, à disfunção das células fagocíticas, o que diminui sua mobilidade e efetividade da limpeza do trato respiratório. Isto leva a um aumento importante de bactérias com inóculos maiores que 10^5 , que superam a capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares, favorecendo a invasão (JAWTEZ *et al.*, 2000).

A mucosa danificada permite que fiquem expostos os receptores específicos favorecendo a aderência de patógenos e posterior invasão (MURRAY, 2010).

A regeneração completa da lesão celular leva aproximadamente trinta dias. Esta lesão reduz a resistência a invasores bacterianos secundários, predispondo o aparecimento de infecções pulmonares subsequentes (MARTINEZ, 2009).

As pneumonias são diagnosticadas com base em critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos. Pode ser definida como presença de sinais e sintomas de disfunção do trato respiratório associado à opacidade na radiografia do tórax (IBIAPINA *et al.*, 2004).

4 - DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS

A pneumonia é uma doença comum, com alta mortalidade, mas infelizmente não existe um padrão ouro para o diagnóstico das pneumonias, a primeira dificuldade é diferenciar entre pneumonia viral e bacteriana. Existem vários métodos de identificação do agente etiológico nas pneumonias, tais como: bacterioscopia e cultura de escarro, sorologias, bacterioscopia e cultura de material obtido por lavado bronco alveolar, broncoscopia com escovado protegido, aspiração transtraqueal e punção aspirativa do pulmão. Mas o agente etiológico é identificado em apenas 50% dos casos. Assim, a terapia inicial para o tratamento da pneumonia é quase sempre empírica. Baseada em diagnóstico clínico e de imagem (ESTEVAN, 2002).

4.1 - Diagnóstico Clínico

Os sinais e sintomas associados à pneumonia bacteriana variam dependendo do patógeno agressor e do estado de imunidade do hospedeiro. Podendo apresentar dor torácica, mal estar, calafrio, febre, tosse produtiva ou não e dor ao respirar. O exame do tórax pode revelar ruídos anormais e evidências de consolidação (MURRAY, 2010).

4.2 - Radiografia do tórax

Para a confirmação do diagnóstico clínico da pneumonia é sempre realizado a radiografia do tórax que fornece indícios importantes sobre a etiologia, distribuição e gravidade da doença (HAYDEN, 2009).

A consolidação lobar ou segmentar sugere um etiologia bacteriana para pneumonia, particularmente para *Streptococcus pneumoniae* ou *Klebsiella pneumoniae*. A consolidação pode obscurecer as bordas entre o pulmão e as estruturas adjacentes como a borda cardíaca e o diafragma (Figura 1). Os infiltrados pulmonares difusos são mais comumente causados por infecções por vírus como citomegalovírus ou influenza, *Legionella pneumophila* ou patógenos oportunistas (HAYDEN, 2010).



Figura 1—Radiografia do tórax de um paciente com pneumonia pneumocócica, mostrando opacidade no lóbulo inferior e lobo médio. Fonte: ESTEVAN, 2002.

4.3 - Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial para pneumonia pode ser definido em diagnóstico específico e não específico. Os exames inespecíficos incluem o hemograma completo e marcadores inflamatórios que ajudam a diferenciar entre causa viral e bacteriana. E os específicos que são os exames microbiológicos que procuram identificar o agente etiológico (IBIAPINA *et al.*, 2004).

O hemograma em casos de pacientes com pneumonia bacteriana geralmente apresenta leucocitose com predomínio de células polimorfonucleares (IBIAPINA *et al.*, 2004).

Os marcadores de resposta inflamatória mais estudados são: proteína C reativa (PCR), interleucina 6 e procalcitonina (IBIAPINA *et al.*, 2004).

4.3.1 -Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é um marcador inflamatório de fase aguda e sua

concentração sérica aumenta intensamente logo com a ocorrência de uma agressão ao organismo. É utilizado como marcador precoce e sensível de respostas inflamatórias (ANDRIOLO, 2004). É utilizada para tentar identificar quadros febris sem foco infeccioso identificado, porém casos de infecção bacteriana podem apresentar valores normais e alguns vírus como adenovírus e influenza podem causar grandes respostas inflamatórias, resultando em valores elevados da proteína C reativa (PCR), sugerindo infecção bacteriana (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.3.2 -Interleucina6

A interleucina6 (IL-6) é um marcador inflamatório já avaliado em infecções respiratórias, observando níveis aumentados em adultos com pneumonia (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Alguns estudos demonstram o aumento da concentração de IL-6 no lavado bronco alveolar e no soro e não somente local. Ocorre um aumento em nível sistêmico induzindo a síntese hepática de proteínas de fase aguda que são observadas durante a inflamação pulmonar (HENRICH, 1990).

4.3.3–Pro-calcitonina

A procalcitonina é uma proteína produzida nas células C da glândula tireóide em condições normais esta proteína está em concentrações muito baixas na circulação, permanecendo no interior das células. Nas infecções bacterianas limitadas a um órgão não se observa aumento significativo da concentração de procalcitonina, mas em processos bacterianos graves como sepse, observa-se níveis muito aumentados desta proteína na circulação (ANDRIOLO, 2004).

4.4 - Diagnóstico microbiológico

4.4.1 - Espécimes Clínicos utilizados para o diagnóstico

3.4.1.1 - Escarro

O exame do escarro é uma ferramenta frequentemente usada na busca da etiologia das pneumonias em paciente com tosse produtiva e capacidade de expectorar, apesar de ser um exame questionável do ponto de vista de sensibilidade e especificidade devido à contaminação deste espécime clínico com bactérias oriundas da microbiota oral (SIGNORI *et al.*, 2008).

A bacterioscopia do escarro é um recurso simples, rápido e barato, podendo ser muito útil quando se tem um material representativo coletado de forma correta e com achados bem definidos (ANVISA, 2004).

Ainda em casos de pneumonia pneumocócica o Gram pode apresentar cerca de 50% de culturas de escarro negativa. O mesmo pode acontecer com infecções por *Haemophilus*. A presença de enterobactérias em culturas de escarro deve ser interpretada com cautela, pois, em cerca de 30% das culturas essas bactérias são provenientes da orofaringe, constituindo assim de uma contaminação do material clínico (GREGORIO, 2005).

4.4.1.2 - Lavado bronco alveolar

O lavado bronco alveolar é um procedimento que permite recuperar componentes celulares e não celulares da superfície epitelial dos alvéolos e bronquíolos, sendo que a superfície epitelial dos alvéolos é representativa de todo o trato respiratório inferior (IBIAPINA, *et al.*, 2004).

O lavado bronco alveolar é uma técnica acessível, muito utilizada e segura desde que se obedeça às normas básicas de broncoscopia como: preparo pré-anestésico, uso adequado de anestésico local, oxigenoterapia e monitorização até duas horas após o procedimento (GREGORIO, 2005).

A coleta pode ser feita em pacientes sob leve sedação, expiração espontânea, com suplemento de O₂ ou em pacientes sob ventilação mecânica (IBIAPINA, *et al.*, 2004). A coleta é realizada após inspeção de toda a árvore brônquica e antes da realização de biopsia e do escovado brônquico. Em adultos o fluido é composto de aproximadamente 88% de macrófagos, 9% de linfócitos, 1% eosinófilo, basófilos e mastócitos e de 1 a 3% de células epiteliais. As células epiteliais escamosas não

devem exceder 3% do total e valores maiores indicam contaminação da coleta por células da via aérea superior (GREGORIO, 2005).

As culturas do material obtido através do lavado bronco alveolar apresentam um método de grande utilidade pra a investigação etiológica principalmente de pneumonias nosocomiais e de imunodeprimidos. (RODRIGUES *et al.*, 2002).

O lavado broncoalveolar na pesquisa etiológica da pneumonia adquirida na comunidade não é recomendado rotineiramente. Dessa forma a terapia empírica baseada nos dados epidemiológicos é a forma de tratamento mais utilizada (IBIAPINA, *et al.*, 2004).

4.4.1.3 -Escovado broncoalveolar

O escovado broncoalveolar é a obtenção de material citológico através de passagem de escova flexível que é atritada contra o epitélio brônquico sob visualização direta ou indireta. A técnica consiste em localizar a lesão da qual se obtém material citológico, passar a escova vigorosamente contra o epitélio da região (RODRIGUES *et al.*, 2002).

O escovado broncoalveolar obtém maior volume de amostra o que aumenta a sensibilidade do método e permite que se realize um maior número de exames para o diagnóstico além da cultura, como exames citológicos, coloração e identificação de micro-organismos específicos, porcentagem de macrófagos e leucócitos contendo micro-organismos e presença de fibras de elastina que indicam necrose pulmonar (ANVISA, 2004).

Esta técnica é uma opção interessante para investigar infiltrados difusos visualizados pela radiografia do tórax além das lesões infiltrativas. Porém esta técnica é de fácil contaminação com amostras de outras áreas (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.4.1.4 - Aspirado de secreção traqueal

O aspirado de secreção traqueal é uma amostra fácil de ser obtida em pacientes entubados, mas é de baixa especificidade devido ao fato de que a colonização endotraqueal ocorre rapidamente após a entubação e ventilação mecânica (ANVISA,

2004). As culturas de secreção traqueal não são recomendadas pela facilidade de contaminação da amostra (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.4.1.5 - Biopsias

Biopsia é o procedimento onde se obtém partes de tecidos do parênquima pulmonar através de prensão e retirada com o uso de pinças. A biopsia pode ser feita de várias formas e só são indicadas em pacientes imunocomprometidos e em crianças com má evolução (ANVISA, 2004).

4.4.1.5.1 - Biópsia pulmonar a céu aberto

As culturas de tecidos pulmonares através de biópsia a céu aberto são obtidas apenas em situações especiais como nos casos de pneumonia grave adquirida na comunidade com má evolução, pneumonia grave em imunocomprometidos e pneumonia nosocomiais mais graves sem agente etiológico identificado. É uma técnica invasiva, porém de alta positividade e de grande representatividade do processo infeccioso pulmonar (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.4.1.5.2 - Biopsia Transbrônquica

É um procedimento invasivo que pode trazer informações semelhantes à punção pulmonar aspirativa e existe desvantagem de menor quantidade de tecido para análise histológica e a impossibilidade de acesso a regiões mais periféricas do parênquima pulmonar (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.4.1.5.3 - Punção pulmonar

A punção pulmonar é um procedimento que quando resulta em cultura positiva é bastante confiável já que a contaminação com a microbiota do trato superior não existe (ANVISA, 2004).

4.5 - Isolamento e identificação bacteriana

Entre os agentes etiológicos bacterianos mais frequentemente isolados em pacientes com pneumonia está o *Streptococcus pneumoniae* que representa de 20 a 60% dos casos (ANVISA, 2010).

Os estreptococos são cocos Gram positivos aos pares e em pequenas cadeias, são micro-organismos fastidiosos que apresentam necessidades nutricionais complexas e crescem somente em meio rico, necessitando de atmosfera de CO₂ (crescimento capnófilico) (MURRAY, 2010).

A semeadura primária é uma das etapas mais importantes da pesquisa microbiológica. Da mesma forma que é importante a boa qualidade da amostra clínica, a seleção correta do meio de cultura e as metodologias a serem utilizadas (ANVISA, 2010).

Qualquer amostra clínica pode ser submetida à cultura, porém algumas são mais solicitadas de acordo com o estado clínico do paciente. No caso do diagnóstico de pneumonia são: escarro, lavado bronco alveolar, escovado brônquico, aspirado de secreção traqueal e biopsias, cada amostra biológica tem técnicas e interpretações diferentes e individuais (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

4.5.1 -Coloração de Gram

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras contendo bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas bactérias associadas às infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

Essa informação permite monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. Os estreptococos aparecem caracteristicamente como cocos Gram positivos, para o caso do *S. pneumoniae* aos pares e em pequenas cadeias circundados por uma cápsula não corada - Figura 2 (MURRAY, 2010).

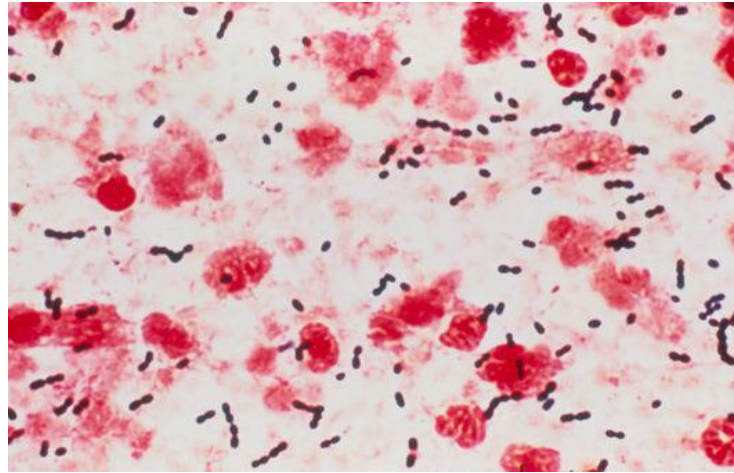


Figura 2- Coloração de Gram realizada em amostra de escarro mostrando morfologia típica de *Streptococcus pneumoniae*. A saber: cocos Gram positivos arranjados em pequenas cadeias, isolados e aos pares. A cápsula é evidenciada pela presença de halo branco ao redor das bactérias coradas em roxo. Evidencia-se ainda nesta lâmina a presença de números leucócitos polimorfonucleares. Fonte: MURRAY, 2010

Em paralelo à realização do Gram e a identificação morfológica da bactéria deve-se realizar a semeadura do material em meios de cultura adequados para proceder a sua identificação (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

4.5.2 - Culturas

A cultura de bactérias é um método clássico de identificação de patógenos. É ideal para se conseguir um número elevado de micro-organismos, para se conhecer suas características, capacidade de crescer em meios seletivos, o aspecto das colônias e a possibilidade de se conhecer a suscetibilidade do patógeno a diversos antimicrobianos (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Para realizar uma cultura bacteriana é necessário meios favoráveis ao crescimento como temperatura e pH ótimos, presença ou ausência de oxigênio, dependendo da bactéria a ser estudada, para que o microrganismo se desenvolva com

sucesso. O meio de cultura mais utilizado para o crescimento das colônias bacterianas pode ser líquido ou sólido, simples ou complexo, mas terá que suportar o desenvolvimento e fornecer nutrientes e condições ideais de crescimento de cada tipo de microrganismo (ANVISA, 2010).

Em caso de suspeita de estreptococos deve-se utilizar meios ricos para favorecer o crescimento, visto que, este microrganismo é fastidioso e necessita de meios nutritivos para o crescimento *in vitro* e algumas cepas dependem do CO₂ para o seu isolamento primário (ANVISA, 2010).

4.5.3 - Semeadura e Isolamento de colônias

Em doenças invasivas, o *S. pneumoniae* pode ser isolado de diferentes amostras clínicas, no caso de suspeita de pneumonia podem ser usados sangue, escarro, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, entre outros (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Os meios de cultura apropriados são essenciais para o sucesso do isolamento e caracterização dos estreptococos e os mais utilizados são: Ágar chocolate, Ágar sangue (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

Em meios de cultura sólidos, as colônias de *S. pneumoniae* são lisas, pequenas, brilhantes, côncavas, podendo exibir uma zona de depressão central causada por uma autólise parcial das células bacterianas. Se o meio de cultura contiver sangue, as colônias serão circundadas por um halo esverdeado de hemólise parcial ou hemólise alfa - Figura 3(ANVISA, 2010).



Figura 3 - Cultura de *Streptococcus pneumoniae* em Agar sangue mostrando colônias lisas, pequenas, brilhantes, com centro umbilicado e alfa hemolíticas (evidenciado pelo halo verde ao redor das colônias).Fonte: MURRAY, 2010

4.5.3.1 -Ágar-chocolate

Ágar-chocolate é um meio nutritivo, que é amplamente utilizado para o cultivo de micro-organismos exigentes e permite o crescimento da maioria das bactérias. À base do meio, é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho em temperatura alta, o que faz com que as hemácias litem, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento dos micro-organismos exigentes (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

Por ser um meio rico em nutrientes o crescimento de micro-organismos pode ser abundante, desta forma deve-se fazer o esfregaço de todas as colônias suspeitas e observar se trata o não do possível patógeno. A placa deve ser incubada a 37°C por 24 horas, em atmosfera de CO₂, devido ao crescimento capnofílico (ANVISA, 2010).

4.5.3.2 -Ágar-sangue

Ágar-sangue (AS) é um meio não seletivo, usado para o isolamento de micro-organismos não fastidiosos e que permite o crescimento de Gram negativos e Gram positivos e permite a visualização de hemólise (MURRAY, 2010).

O meio de Ágar sangue, usando uma base rica, oferece ótimas condições de crescimento à maioria dos micro-organismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. No AS o *S. pneumoniae* são circundados de um halo esverdeado representando uma hemólise parcial ou alfa hemólise. A cor original do meio é vermelha e a presença de halos esverdeados representam uma lise parcial dos eritrócitos denominada alfa hemólise. A placa deve ser incubada a 37°C por 24 horas, em atmosfera de CO₂, devido ao crescimento capnofílico (ANVISA, 2010).

4.6 -Identificação bacteriana

A identificação do pneumococo isolado em cultura é baseada na morfologia bacteriana e coloração de Gram de material à fresco e de colônias, características do crescimento e reação hemolítica em placas de ágar sangue de carneiro a 5%, ausência de catalase, sensibilidade em presença de optoquina e lise na presença de desoxicolato de sódio (bile solubilidade) (ANVISA, 2010).

4.6.1 -Teste da catalase

A presença da catalase permite separar os *Streptococcus spp.*, catalase negativa, de outros cocos Gram-positivos produtores de catalase, por exemplo, *Staphylococcus spp.* A enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A liberação do oxigênio se observa pela formação de bolhas. Não havendo formação de bolhas, o teste é negativo e indicativo do gênero *Streptococcus* (ANVISA, 2010).

4.6.2 -Prova da optoquina

A optoquina (etil-hidrocupreína-hidroclorídrica) é uma droga solúvel em água que se difunde rapidamente em meio de cultura sólido. Para este teste, em geral, utiliza-se o disco de optoquina de 6 mm contendo 5 µg da droga, que é colocado na placa de AS após a absorção da solução pelo meio de cultura. O teste tem sensibilidade maior que 95%, sendo considerado de baixo custo e simples de ser realizado. Incubar a 37°C e 5 - 7% de CO₂ por 24 h; Fazer a leitura do halo de inibição do crescimento bacteriano (ANVISA, 2010).

O teste de sensibilidade a optoquina positivo (presença de halo de sensibilidade) é também indicativo de *S. pneumoniae*.

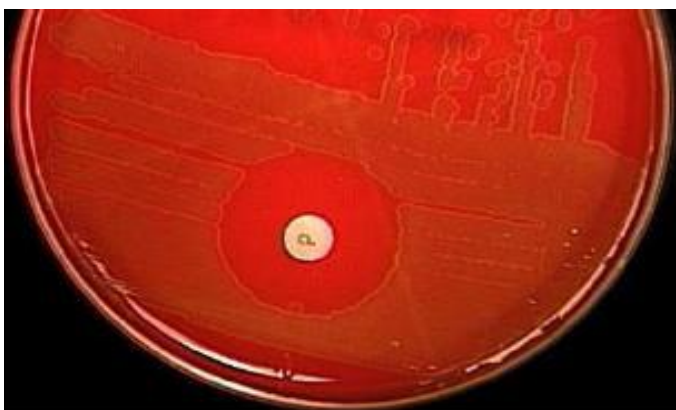
4.6.3 -Teste da solubilidade em bile (desoxicolato de sódio a 2%)

Detergentes fracos, como os sais biliares desoxicolato de sódio têm a capacidade de lisar seletivamente o *S. pneumoniae* em fase logarítmica do crescimento. Estes sais ativam as enzimas autolíticas (autolisinas) produzidas pelo pneumococo, acelerando a reação lítica natural da bactéria. O teste da bile-solubilidade pode ser realizado tanto em meio de cultura líquido como sólido. A turvação produzida por uma suspensão de pneumococo ficará completa ou parcialmente límpida ao se adicionar os sais biliares. Em meio sólido, as colônias bile-solúveis “desaparecem” em contato com algumas gotas desta solução e o teste é um pouco mais difícil de ser visualizado. A leitura é feita de preferência contra um fundo escuro, observando a turvação. O clareamento da turbidez reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova. O teste em placa consiste de inoculação de gotas de desoxicolato de Sódio a 2% sobre as colônias suspeitas e incubação a 35°C por 30 minutos. As colônias positivas irão desaparecer por lise bacteriana. (ANVISA, 2010). O teste bile solubilidade positivo é indicativo de *S. pneumoniae*.

Catalase



Sensibilidade à optoquina, alfa hemólise



Solubilidade em bili

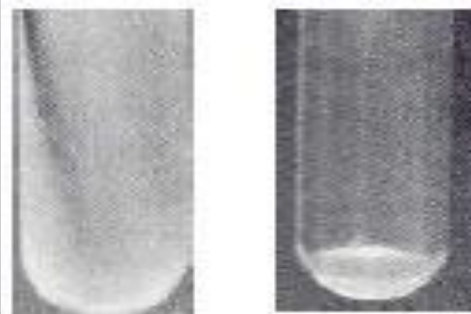


Figura 4 – Testes utilizados na identificação de *S. pneumoniae*. Teste de catalase, sensibilidade à optoquina (colônias alfa hemolíticas em ASA) e bili solubilidade.

Assim, a presença de crescimento em Agar chocolate, um esfregaço corado pelo Gram apresentando características de diplococos lanceolados Gram-positivos; o crescimento em ágar-sangue em ambiente de CO₂ com produção de alfa hemólise; a reação de catalase negativa, presença de sensibilidade à optoquina e a presença de bile solubilidade, confirmam um diagnóstico de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*.

4.6.4 – Antibiograma

O tratamento para as infecções pneumocócicas geralmente é baseado na terapia empírica. Mas diante do isolamento da bactéria em cultura e do antibiograma, a antibioticoterapia pode ser devidamente ajustada. A realização do antibiograma é de extrema importância devido ao aumento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a múltiplos antibióticos, incluindo a penicilina (MURRAY, 2010).

A penicilina é a droga de escolha para muitas doenças pneumocócicas, entretanto, com a descrição crescente de cepas resistentes à penicilina a partir da década de 80, esquemas alternativos têm sido propostos (WOLKERS, 2009).

Desta forma, para o tratamento adequado das pneumonias, considera-se de fundamental importância a realização do exame microbiológico com a identificação do patógeno e a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

5 - CONCLUSÃO

A pneumonia é um distúrbio infeccioso e inflamatório que se instala nos pulmões quando os mecanismos de defesa não são eficazes, tornando o hospedeiro suscetível a instalação da doença. Vários fatores favorecem o aparecimento da pneumonia, entre eles o foco deste trabalho, que são as infecções virais.

As infecções pelo vírus influenza provocam a destruição celular e a descamação da mucosa superficial das vias respiratórias. Além disso, aumentam a suscetibilidade dos pacientes à superinfecção bacteriana, devido à perda do processo de depuração ciliar e a disfunção das células fagocíticas, o que diminui a mobilidade e efetividade da limpeza do trato respiratório. A mucosa danificada permite que fiquem expostos os receptores específicos favorecendo a aderência de patógenos e posterior invasão.

Apesar de ser um problema de saúde pública, muitas vezes não é dado o valor devido a esta patologia, ficando apenas com o tratamento empírico baseado em diagnóstico e de imagem. O diagnóstico microbiológico é extrema importância para identificação correta do patógeno e uma terapia eficaz. Favorecendo a cura do paciente e uma melhor expectativa de vida.

REFERÊNCIAS

- ANDRIOLO, Adagmar; COSTA, Roberta Pasianotto; NOVO, Neil Ferreira. Pró-calitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v.40, n.3, jun. 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: ANVISA, 2004. 381 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/introducao.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2012.
- CORREA, J. C. I Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. **J. Pneumol.**, Brasília, v.24, n. 2, p. 63-68, mar./abr. 1998.
- CUNHA, Burke A.; FREED, Mark S. Princípios gerais sobre pneumonias. In: CUNHA, Burke A.; FREED, Mark S. **Fundamentos em pneumonias**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. v 1, cap 1, p.17-42.
- ESTEVAN, MIGUEL. Examen radiográfico del tórax en lasneumonías de probable causa bacteriana. **ArchPediatr Urug.** Uruguai, v.73, n.1, jan. 2002.
- GARCIA, Cristiana Couto. **Papel do receptor de fator de ativação plaquetária na infecção experimental pelos vírus influenza A**. 2009. 136f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GOMES, Lucy. Fatores de risco e medidas profiláticas nas pneumonias adquiridas na comunidade. **J. Pneumologia**, Brasília, v.27, n.2, abr. 2001.
- GREGORIO, Marcelo Gervilla. Lavado broncoalveolar. **Boletim Pneumologia Paulista**, São Paulo, v.28, 2005.
- HAYDEN, Frederich G. Influenza. In: CECIL, Roussell L. **Tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 87, p. 2849 – 2855.
- HEINRICH *et al.* **Interleucina 6**. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/projetos/pneucito/il6.html>>. Acesso em 18 mar. 2012.

IBIAPINA, Cassio da Cunha, etall. Pneumonias comunitárias na infância: etiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev. Med. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 14, n. 1, 2004.

JAWETZ, E; MELNICK, J. L.; ALDEBERG, E. A. Orthomixovirus (Vírus da influenza). In: JAWETZ, E; MELNICK, J. L.; ALDEBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 21 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2000. v.1, cap.39, p. 395-404.

MANDELL, Leonel A. Pneumonia pneumocócica. In: CECIL, Rousell L. **Tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 311, p. 2500-2506.

MARTINEZ, José Antônio Baddini. Influenza e publicações científicas. **J. bras.Pneumol.** , São Paulo, v.35, n.5, mai. 2009.

MIMS, C. A., et all. Infecções do trato respiratório inferior. In: MIMS, C. A., et all. **Microbiologia médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 19. p. 235-258.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. Streptococcus. In: MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap.22, p. 224-242.

OPLUSTIL, Carmem Paz, etall. Cultura de amostras do trato respiratório inferior. In: OPLUSTIL, Carmem Paz, etall. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Savier, 2004. Cap. 16, p. 141-146.

RODRIGUES, Joaquim Carlos; SILVA FILHO, Luiz Vicente Ferreira da; BUSH, Andrew. Diagnóstico etiológico das pneumonias – uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, n2, ago. 2002.

SIGNORI, Leonardo G. Haas, *etall*. Exame de escarro no manejo clínico de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade. **J. Pneumologia**, São Paulo, v.34, n.3, mar. 2008.

WOLKERS, Paula Caroline Bejo, etall. Novos pontos de corte de sensibilidade nas taxas de resistência antimicrobiana de cepas invasivas de pneumococos. **J. Pedriat.**, Rio de Janeiro. v.85, n.5, out. 2009.