

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Ana Beatriz Mori Lima

**PREVALÊNCIA DE BASTONETES GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DA
NASOFARINGE DE CRIANÇAS DE CRECHES DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Cristina Pimenta

Goiânia

200

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Ana Beatriz Mori Lima

**PREVALÊNCIA DE BASTONETES GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DA
NASOFARINGE DE CRIANÇAS DE CRECHES DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre na área de
concentração em Microbiologia.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Cristina Pimenta

Goiânia

2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

L732p Lima, Ana Beatriz Mori.
Prevalência de bastonetes gram-negativos isolados da nasofaringe de crianças de creches do município de Goiânia / Ana Beatriz Mori Lima. – 2007.
ix,60 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.

Bibliografia.

Inclui anexos.

1. Nasofaringe – Crianças de creche – Goiânia (GO) 2. Bastonetes gram-negativos 3. Doenças infecciosas - Crianças I. Pimenta, Fabiana Cristina II. Universidade Federal de Goiás. **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 579.842.1-053.2(817.3)

“Se soubermos que um obstáculo é transponível,
este deixa de ser um obstáculo para tornar-se um
ponto de partida.”

Jozsef Eorvos

Aos meus pais Wagner e Aiako e às minhas queridas irmãs Ana Flávia, Ana Carolina e Ana Gabriela pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus por ser presença constante em minha vida e por estar sempre iluminando meus passos.

Aos meus pais, Wagner Silva Lima e Aiako Mori Lima, meus exemplos de vida, e às minhas queridas irmãs Ana Flávia, Ana Carolina e Ana Gabriela Mori Lima por todo carinho, apoio, compreensão e, principalmente por tornarem meus dias mais felizes.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Cristina Pimenta, por ter acreditado no meu potencial desde o início, pelos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento profissional, por ter aceitado a missão de conduzir este trabalho e, principalmente pela motivação e inspiração diárias. Pessoa por quem tenho enorme admiração, respeito e eterna gratidão.

À Prof^ª. Lara Stefânia N. O. Leão, pela paciência, generosidade, palavras de incentivo e, principalmente pela amizade. Pessoa por quem me encantei desde o primeiro dia de aula e que conquistou minha confiança e admiração.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Médica e Ambiental: Juliana Lamaro Cardoso, Cristyane Gonçalves Benício da Rocha Bastos, Luciana Oliveira, Laurine Lacerda, Denise Gonçalves Oliveira, Juliane A. de Lima, Marina Eidt, Ana Cláudia Alves de Oliveira, Josiene Moreira dos Santos, Silvana Santiago, Liana Jayme Borges, Patrícia Staciarini Anders, Daniella Vilela Lima, Aysha Jussara Ivonilde Carrim, Thais Maitan Vieira, Fernando de Souza Vaz, Wesley Rogério Oliveira, Leda Maria Valadão pelos momentos agradáveis compartilhados, pelos conselhos, pelo auxílio na realização das atividades e principalmente pela maneira tão carinhosa que fui recebida no laboratório.

Às colegas do Mestrado: Diana Christina Gonçalves, Juliana Oliveira Rosa, Jackeline Maciel Barbosa, Elaine Dhremer, Ariana Alves, Natália Carvalhaes de Oliveira, Lorena Cristina dos Santos, Camila Xavier, Marlene Andrade Martins, pela convivência e pelos conhecimentos compartilhados ao longo desta caminhada.

Aos professores do Mestrado: Cleomenes Reis, José Daniel Gonçalves Vieira, André Kipnis, Maria do Rosário Rodrigues da Silva, João Bosco Siqueira Júnior, Celina Maria Turchi Martelli, Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade quero expressar a minha gratidão e respeito a todos.

Aos professores: José Daniel Gonçalves Vieira, José Rodrigues do Carmo Filho, Sílvia Helena Rabelo dos Santos, Maria do Rosário Rodrigues da Silva, Lúcia Kioko Hashimoto e Souza, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro pelas sugestões que muito contribuíram para a lapidação desta dissertação.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade pela coordenação do Projeto de Vigilância das Pneumonias e Meningites em Crianças no Município de Goiânia, do qual foram obtidas as amostras para a realização do estudo.

À Lícia Kamila Melo pela enorme colaboração na análise do banco de dados.

Ao Prof. José Rodrigues do Carmo Filho pela gentileza de ter cedido as cepas que foram utilizadas como controle de qualidade para os testes bioquímicos e de suscetibilidade realizados no presente estudo.

À Prof^ª. Dr^ª. Mariângela Fontes Santiago pelos incentivos e ensinamentos repassados durante a graduação e por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa científica.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia pela agradável convivência, profissionalismo e amizade.

Aos meus queridos alunos pelo carinho e pelos conhecimentos compartilhados no decorrer deste ano.

Ao Dr. Bart Wolf pela generosidade e por compartilhar seus conhecimentos e experiências na elaboração desta dissertação.

Ao PPGMT pela oportunidade e CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta dissertação fica aqui o meu muito obrigada...

Sumário

Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	13
1.1. Crianças e doenças infecciosas	13
1.2. Agente etiológico	16
1.3. Colonização da nasofaringe	17
1.4. Produção de beta-lactamases: mecanismo de resistência dos BGN	19
2. Objetivos	23
3. Material e Métodos	25
3.1. Área e população de estudo	25
3.2. Coleta e transporte	25
3.3. Isolamento e armazenamento	26
3.4. Identificação	26
3.4.1. Identificação presuntiva	26
3.4.2. Fermentação dos carboidratos	27
3.4.3. Produção de indol	27
3.4.4. Produção de vermelho de metila	28
3.4.5. Prova de utilização do citrato	28
3.4.6. Produção de urease	28
3.4.7. Produção de fenilalanina-desaminase	28
3.4.8. Produção de sulfeto de hidrogênio	29
3.4.9. Motilidade	29
3.5. Teste de suscetibilidade	29
3.5.1. Discos de difusão	29
3.6. Processamento e análise de dados	30
4. Resultados, discussão e conclusões	32
5. Referências bibliográficas	34
6. Anexos	50

Resumo

Introdução: a nasofaringe (NF) constitui o reservatório ecológico primário ou fonte de disseminação de microrganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e bastonetes Gram-negativos (BGN). Vários estudos demonstraram que colonização nasofaríngea assintomática é prevalente em crianças e precede o desenvolvimento de doença invasiva. Crianças que freqüentam creches atuam como um importante vetor para disseminação horizontal de patógenos respiratórios e BGN dentro da comunidade. As crianças são suscetíveis à condição de portador e assumem um papel fundamental na epidemiologia de infecções respiratórias. A microbiota da nasofaringe é formada durante os primeiros anos de vida e é densamente colonizada por uma variedade de microrganismos, bactérias comensais assim como patógenos que podem causar infecções. Estudos epidemiológicos demonstram que muitos fatores influenciam o padrão de colonização da NF por BGN: idade, sexo, estação do ano, infecções respiratórias, contato com outras crianças, condição sócio-econômica, tamanho das famílias, países tropicais, exposição passiva a fumantes e antibioticoterapia. **Objetivo:** este estudo objetivou determinar a prevalência e padrão de suscetibilidade de BGN isolados da nasofaringe de crianças menores de 5 anos de idade que freqüentam creches no município de Goiânia. **Métodos:** a investigação é parte de um sistema de vigilância ativa, prospectiva e populacional de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* em crianças de 62 creches. O estudo foi realizado no período de agosto a dezembro de 2005 e foram coletadas 1192 amostras. As coletas de espécimes da nasofaringe foram realizadas com um transwab, extrafino e flexível, inoculado no meio modificado para transporte de Stuart e enviado ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Goiás-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública para processamento. Os isolados foram identificados pela morfologia da colônia, coloração de Gram e testes bioquímicos padronizados. O perfil de suscetibilidade foi determinado pelo método de disco difusão. **Resultados:** um total de 106 (8,9%) BGN foram isolados da nasofaringe de crianças e 13 espécies foram identificadas. As espécies mais freqüentes: foram vinte e seis (24,5%) *Enterobacter aerogenes*, dezessete (16,0%) *K. pneumoniae*, onze (10,4%) *E. coli*, oito (7,5%) *E. agglomerans*, cinco (4,7%) *Pseudomonas sp.* Observou-se que quarenta e três (57,3%) BGN apresentaram resistência a ampicilina; vinte (26,7%) foram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim; dezoito (24,0%) mostraram resistência a amoxicilina-ácido clavulânico e nove (12,0%) apresentaram resistência a tetraciclina. **Conclusão:** no presente estudo observou-se que crianças que freqüentam creches no município de Goiânia podem ser portadores de BGN e, portanto, assumem um papel fundamental na disseminação de microrganismos envolvidos em infecções comunitárias. É necessário que mais estudos sejam desenvolvidos para estabelecer estratégias mais eficazes para minimizar o problema da colonização nasofaríngea e de infecções adquiridas da comunidade devido à importância e seriedade que ambas representam no cenário da saúde pública.

Abstract

Introduction: the nasopharynx (NP) constitutes the primary ecological reservoir or source of dissemination of microorganisms as *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacilli (GNB). Several studies demonstrated that asymptomatic nasopharyngeal (NP) carriage of pathogens is prevalent in young infants and precedes the development of invasive disease. Children in day-care centers act as an important vector for horizontal spread of the respiratory pathogens and GNB within the community. The infants are susceptible to condition of carrier and take a fundamental role in the epidemiology of respiratory infections. The nasopharyngeal flora becomes established during the first year of life and is densely colonized by a broad variety of microorganisms, commensal bacteria as well as potential pathogens that may cause infections. Epidemiologic studies demonstrate that many factors influence nasopharyngeal carriage rates: age, gender, season, acute respiratory illness, exposure to other children, socio-economic status, family size, warm-climate countries, passive smoking exposure, antibiotic therapy are risk factors of colonization of the NP by BGN. **Objective:** this study aimed to determinate the prevalence and susceptibility pattern of BGN isolated from NP of children less than five years old attending day-care centers at municipality of Goiânia. **Methods:** the investigation was conducted in the municipality of Goiânia as part of an ongoing prospective surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* in children of 62 day-care centers. The surveillance was carried out from August to December, 2005 and was collected 1192 samples. The nasopharyngeal specimens were collected with a transwab, extrathin and flexible, placed in Stuart transport medium tubes and transported to the Laboratory of Bacteriology of the Federal University of Goiás-Institute of Tropical Pathology and Public Health to processing. The isolates were identified by colony morphology, Gram staining technique and according to standardized tests. Susceptibility tests were performed by the disk diffusion method. **Results:** a total of 106 (8,9%) Gram-negative bacilli were isolated and 13 species were identified. The species more prevalent were twenty-six (24,5%) *Enterobacter aerogenes*, seventeen (16,0%) *K. pneumoniae*, eleven (10,4%) *E. coli*, eight (7,5%) *E. agglomerans* and five (4,7%) *Pseudomonas sp.* It was observed that forty-three (57,3%) GNB were resistant to ampicillin; twenty (26,7%) to trimethoprim-sulfamethoxazole; eighteen (24,0%) showed resistance to amoxicillin-clavulanic acid and nine (12,0%) presented resistance to tetracycline. The production of extended-spectrum beta-lactamase was not detected. **Conclusion:** in this study was demonstrated that young children attending in day-care centers at municipality of Goiania might be GNB carrier and therefore have a fundamental role in the dissemination of microorganisms involved in community-acquired infections. It is necessary that more studies be developed to establish strategies more effective to minimize the problem of the nasopharyngeal colonization and community-acquired infections due to importance and seriousness that both represent in the public health.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Crianças e doenças infecciosas

Consideradas o futuro da humanidade pelo ilimitado potencial de que são dotadas, as crianças (0-12 anos) representam do total da população mundial, aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas. A sobrevivência e o desenvolvimento delas dependem da garantia de necessidades básicas ao suporte à vida como segurança e ambiente saudável (WHO 2002a).

Como estão expostas a vários fatores de risco, cerca de 40% da carga global de doenças atribuídas a fatores ambientais recaem sobre crianças menores de cinco anos de idade, que representam em torno de 10% da população mundial. Os fatores de risco ambientais frequentemente atuam em conjunto, tendo seus efeitos exacerbados pelas condições econômicas e sociais adversas, particularmente por conflitos, pobreza e desnutrição (Alcântara & Marcondes 1978, Behrman & Kliegman 1999, WHO 2002a).

Estima-se que, aproximadamente 11 milhões de crianças morram por ano antes de alcançarem o quinto ano de vida. Cerca de dois terços do total de mortes ocorre no primeiro mês de vida. Aproximadamente 29 mil crianças menores de cinco anos morrem todos os dias sendo que a maioria destas mortes poderia ser evitada se intervenções simples e de baixo custo fossem adotadas. O abismo entre as taxas de mortalidade infantil de países desenvolvidos e em desenvolvimento é enorme. Nos países desenvolvidos, 6/1000 crianças morrem antes de completar cinco anos de idade, já nos países em desenvolvimento a taxa pode variar de 88 a 120/1000 crianças dependendo da região (WHO 2004, ONU 2006, Unicef 2006).

Porém, a somatória dos esforços para a melhoria da saúde global, especialmente o acesso da população aos serviços de saúde, o incentivo ao aleitamento materno, as campanhas da vacinação em massa, implantação dos agentes comunitários de saúde, teve como consequência a redução da taxa de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade, principalmente após o período neonatal (PAHO 2006, Unicef 2006). Importantes avanços desenvolvidos por alguns países mostram que estratégias simples e eficazes podem funcionar bem em grandes escalas. Em 1990, durante o seminário sobre

sobrevivência infantil organizado pelo governo da Noruega, a revista científica *The Lancet* e o Unicef, as nações do mundo comprometeram-se a reduzir em 2/3, até 2015, a taxa de mortalidade de crianças menores de cinco anos. A redução é parte do Quarto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio que diz respeito ao combate à mortalidade infantil. Sabe-se que 90 países encontram-se no caminho certo para atingir a meta, porém, outros 98 países ainda têm uma longa trilha a percorrer. No Brasil, desde 1990 o ritmo de redução da mortalidade na primeira infância tem sido de aproximadamente 4,3% ao ano e, portanto a meta deverá ser cumprida. Até 2015, o país deve conseguir reduzir a taxa de mortalidade de menores de cinco anos para 20/1000 nascidos vivos (ONU 2006).

Diante da escassez de publicações relacionadas à etiologia e características clínicas das infecções bacterianas em crianças, especialmente no mundo em desenvolvimento, a WHO conduziu um estudo multicêntrico em quatro países em desenvolvimento: Filipinas, Gâmbia, Etiópia e Papua Nova Guiné. O estudo incluiu 4.552 crianças de idade superior a 90 dias, atendidas em ambulatórios dos hospitais de referência de seus países. Das 4.552 crianças, 249 (5,4%) morreram, 386 (8,5%) tiveram doença grave evidenciada por cultura positiva do sangue e líquido cefalorraquidiano (líquor) e hipóxia grave e 450 (9,9%) apresentaram hipóxia moderada ou radiografias pulmonares sugestiva de pneumonia. A mortalidade foi elevada em crianças com cultura positiva do sangue (31%) em relação as que apresentaram cultura negativa e morreram (9%). Cento e sessenta e sete (167) crianças tiveram infecção bacteriana comprovada, tendo como principais agentes etiológicos, em 60% dos casos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e/ou *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A. *S. pneumoniae* foi o microrganismo mais comumente isolado com elevadas taxas de mortalidade (33%). *S. aureus* e *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A foram causas importantes de sepse e morte. As bactérias Gram-negativas foram menos comumente isoladas que as Gram-positivas (WHO 1999 a, WHO 1999b).

Considerado um país em desenvolvimento, o Brasil possui uma população estimada em 189.484.801, dentre as quais, 19.813.755 são crianças de zero a cinco anos de idade. Apresenta uma taxa de mortalidade infantil de 25,8 e 32,3 por 1000 nascidos vivos para menores de um e cinco anos, respectivamente. Entre estas crianças, as causas de morte que se podem destacar são: doenças comunicáveis (43%), causas externas

(22,5%), doenças do sistema respiratório (8,2%), doenças diarréicas e infecções respiratórias agudas (7%) (PAHO 2002, IBGE 2006).

Os indicadores de saúde, particularmente os baseados em dados de mortalidade são utilizados para diagnosticar problemas e apontar prioridades. Destacam-se a taxa de mortalidade infantil e as taxas de mortalidade de menores de cinco anos. Esses indicadores são muito úteis principalmente em áreas carentes como na maioria dos países em desenvolvimento. Porém, a construção desses indicadores, na maioria dessas regiões, está bastante prejudicada devido à má qualidade dos registros de nascidos vivos e de óbitos, principalmente para menores de um ano. Assim, não raro, baixas taxas de mortalidade infantil podem ser resultantes de sub-registro de óbitos e não o reflexo de boas condições de saúde da população infantil (ONU 2006).

Para a maioria das regiões brasileiras, inexistem informações confiáveis a respeito de indicadores básicos de saúde infantil, tais como desnutrição, cobertura vacinal, frequência de doenças infecciosas como diarreia e infecções respiratórias ou as características da assistência perinatal. Justamente nessas áreas, as mais pobres do país, que a mortalidade infantil apresenta seus maiores índices. A falta de informações adequadas torna difícil, senão impossível, o planejamento de ações de saúde visando a sobrevivência infantil (Barros & Victora 1994).

O país atualmente ocupa a 85ª posição entre 192 países em estudo sobre a taxa de mortalidade realizado pelo Unicef. Os países que apresentam os piores indicadores aparecem nas primeiras posições, a situação da África é a pior em nível mundial. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), entre os anos de 2000 e 2005, a mortalidade infantil no Brasil reduziu 14,3%. Os indicadores declinaram de 30,1 para 25,8 por 1000 nascidos vivos para menores de um ano, porém o maior desafio do país é reduzir as discrepâncias entre estados e regiões (IBGE 2006, Unicef 2006).

A capacidade de diagnosticar e instituir o tratamento apropriado das infecções durante a infância depende do conhecimento da epidemiologia e de vários fatores de risco associados a cada agente infeccioso, bem como da população de risco para determinados patógenos. A suscetibilidade aos agentes infecciosos está intimamente relacionada ao sistema imune, exposição a patógenos em potencial e presença de doenças subjacentes (Behrman & Kliegman 1999).

1.2. Agente etiológico

Os bastonetes Gram-negativos (BGN) estão divididos em dois grandes grupos: a família *Enterobacteriaceae* e os não fermentadores. A família *Enterobacteriaceae* constitui um grupo grande e heterogêneo de bactérias. Os principais gêneros são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Morganella*, *Providencia* e *Yersinia*. Apresentam-se como bastonetes ou cocobacilos Gram-negativos, não esporulados, com motilidade variável, são anaeróbios facultativos. A grande maioria fermenta a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, não possuem a enzima citocromo oxidase e reduzem nitrito a nitrato (ANVISA 2005, Koneman et al. 2005).

Esses microrganismos estão distribuídos amplamente na natureza, são encontrados no solo, água, plantas e na microbiota do trato intestinal de humanos e animais. Entre as infecções causadas por esses microrganismos, destacam-se: diarreias, pneumonia, infecções do trato urinário, sepse, meningite, infecções em sítio cirúrgico (Koneman et al. 2005).

As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os bastonetes Gram-negativos (BGN) de importância clínica isolados na rotina microbiológica dos serviços de saúde. São responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Estão associados às infecções hospitalares e, os principais gêneros isolados são: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Serratia*. Nas infecções da comunidade, destacam-se: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (ANVISA 2005, Koneman et al. 2005).

Os bastonetes Gram-negativos classificados como não fermentadores são microrganismos aeróbios, não esporulados, que caracterizam-se pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia pela fermentação, degradando-os pela via oxidativa. A identificação dos bastonetes Gram-negativos não fermentadores representa um grande desafio para os laboratórios que possuem rotina microbiológica, considerando que a maioria deles não realiza este tipo de identificação, ou o faz de maneira elementar. Isso ocorre em virtude da reduzida frequência desses patógenos em

amostras ambulatoriais, assim como pela complexidade e o elevado custo dos esquemas completos de identificação (ANVISA 2005).

A caracterização deste grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecção hospitalar. Embora a sua frequência, mesmo em hospitais, seja pequena quando comparada a outros agentes etiológicos, geralmente os bastonetes não fermentadores apresentam resistência a vários antimicrobianos e são capazes de causar infecções graves. Estas bactérias colonizam e causam infecções, especialmente em pacientes debilitados oriundos de unidades de terapia intensiva e/ou submetidos a procedimentos invasivos. O número de bastonetes não fermentadores conhecidos é muito grande, entretanto as espécies de maior importância clínica na atualidade são: *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Stenotrophomonas* spp. e *Moraxella* spp. (ANVISA 2005, Koneman et al. 2005).

1.3 Colonização da nasofaringe

A nasofaringe (NF) constitui o reservatório ecológico primário ou fonte de disseminação de vários microrganismos incluindo os bastonetes Gram-negativos (BGN), que geralmente são transmitidos por meio de gotículas e aerossóis contendo microrganismos viáveis de secreções do trato respiratório. Estudos mostram que crianças com infecção respiratória aguda (IRA) e que frequentam creches atuam como importante vetor na disseminação horizontal de patógenos respiratórios e BGN dentro da comunidade (Gray et al. 1980, Gatica-Marquina et al. 1993, Peñuela et al. 1999, Briles et al. 2000, Wolf et al. 2001, Masuda et al. 2002, Dunais et al. 2003, Numazaki et al. 2004).

A microbiota da nasofaringe em crianças é formada durante os primeiros anos de vida. A NF é densamente colonizada por uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias comensais bem como patógenos que podem causar infecções mais severas. Vários estudos mostram que doenças invasivas são precedidas por colonização nasofaríngea e que crianças são especialmente suscetíveis à condição de portador. Na maioria dos casos, a criança é portadora, mas não apresenta sintomas clínicos. Porém, quando ocorrem alterações nos sistema imunológico do hospedeiro, os microrganismos

que colonizam a NF podem invadir sítios adjacentes e/ou alcançar a corrente sanguínea promovendo o início da infecção (Ghaffar et al. 1999, Lieberman et al. 1999, Wolf 2000, Debbia et al. 2001, Lencastre & Tomasz 2002, Rodríguez & Martinez 2002).

Estudos epidemiológicos mostraram que fatores potenciais como: idade, sexo, frequência em creches, infecções virais do trato respiratório, exposição passiva de crianças com fumantes, contato com outras crianças, baixas condições sócio-econômicas, número elevado de membros nas residências, sazonalidade, níveis reduzidos de produção de saliva e antibioticoterapia estão entre os principais fatores associados ao risco de colonização da nasofaringe pelos BGN. A saliva apresenta diversas características e uma de suas principais funções é inibir a multiplicação microbiana na boca pela presença de moléculas como a imunoglobulina A e a lactoferrina, conhecidas por manter efeitos protetores no trato respiratório superior limitando a aderência e invasão microbiana. Muitos estudos reforçam a hipótese de que crianças que apresentam níveis reduzidos de saliva são mais frequentemente colonizadas por BGN, *S. aureus* e patógenos respiratórios. Isso ocorre devido à diminuição de substâncias com atividade antimicrobiana na saliva, que alteram a imunidade, aumentando assim a possibilidade de colonização nasofaríngea e o subsequente desencadeamento de doenças invasivas (Ussery et al. 1996, Ghaffar et al. 1999, Principi et al. 1999, Marchisio et al. 2001, Ghaffar et al. 1999, Rodríguez & Martinez 2002, Garcia R 2005).

Uma importante lacuna no conhecimento regional e nacional refere-se à determinação da prevalência de bastonetes Gram-negativos (BGN) na nasofaringe de crianças. Os portadores nasais de BGN assumem papel fundamental na epidemiologia destas infecções e a colonização por BGN pode ser considerada um evento freqüente em países tropicais (Wolf et al. 2001). Estudos tem mostrado que a colonização da nasofaringe por patógenos é muito comum na infância e depende de fatores individuais e sociais. Tais fatores como a incapacidade de eliminar o patógeno e a produção de beta-lactamases observados em algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, aumentam a resistência do microrganismo e dificultam sua erradicação sendo, portanto considerados problemas mundiais de saúde pública, principalmente em população pediátrica (Rodríguez & Martinez 2002, Paterson & Bonomo 2005, Pitout et al. 2005).

Na última década, no Brasil, poucos estudos foram conduzidos com intuito de avaliar a colonização microbiana da nasofaringe de crianças com idade inferior a cinco anos (Andrade et al. 2003, Laval 2003). Alguns estudos mostraram que em países tropicais os bastonetes Gram-negativos podem colonizar a nasofaringe (Weissenbacher et al. 1990, Suttmoller et al. 1995). Wolf et al. (1999) realizaram um estudo envolvendo crianças saudáveis da Angola, Brasil e Holanda para verificar a presença de BGN na nasofaringe. Fizeram parte do estudo crianças com idade entre quatro meses e cinco anos que freqüentavam creches e clínicas de imunização. As crianças que faziam uso de antibióticos foram excluídas do estudo. Houve uma maior freqüência de colonização nasofaríngea por bastonetes Gram-negativos em crianças angolanas e brasileiras, 57% e 50%, respectivamente, quando comparado às crianças holandesas (4%). Um possível fator associado à detecção de BGN foi o elevado número de membros nas famílias dos países em desenvolvimento, o que aumentou o risco de propagação de microrganismos por meio de gotículas e/ou de aerossóis.

Wolf et al. (2001) avaliaram a colonização da nasofaringe por bastonetes Gram-negativos em crianças de dois meses a cinco anos de idade. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos também foi investigado. Fizeram parte do estudo 912 crianças, 482 apresentavam pneumonia e 430 faziam parte do grupo controle. As enterobactérias foram detectadas em 79 (16%) das 482 crianças com pneumonia e em 51 (12%) das 430 crianças do grupo controle. Os BGN não fermentadores foram detectados em 85 (18%) das crianças com pneumonia e 54 (13%) do grupo controle. O estudo não conseguiu correlacionar a presença de BGN com estado nutricional das crianças, estação do ano, uso de antimicrobianos nem admissão em hospitais. Entretanto, verificaram que a associação do estado de portador com o quadro de pneumonia. A colonização concomitante por *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae* foi relacionada com a diminuição no isolamento de BGN.

1.4. Produção de beta-lactamases: mecanismo de resistência dos BGN

A produção de beta-lactamases foi o primeiro mecanismo de resistência bacteriana observado na terapia com antibióticos beta-lactâmicos e continua sendo a

principal causa de resistência de bactérias Gram-negativas (Paterson & Bonomo 2005). As taxas de resistência bacteriana estão intimamente relacionadas ao seu uso na comunidade e no ambiente hospitalar. Bactérias naturalmente resistentes podem ser selecionadas durante o uso de determinados antimicrobianos, levando à falência clínica (Livermore 1991, Sanders & Sanders 1992).

A resistência microbiana pode ser natural ou adquirida. De modo geral, a resistência natural das espécies bacterianas aos antimicrobianos está relacionada com a incapacidade dos mesmos em atingir seus sítios de ação, enquanto que a aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre em decorrência de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente (Neves et al. 1999).

No caso dos beta-lactâmicos, as bactérias geralmente tornam-se resistentes a esses antibióticos pela destruição ou inativação da droga devido à produção de beta-lactamases. Estas substâncias são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico, transformando os antibióticos correspondentes em produtos inativos (Jawetz et al. 1998, Paterson & Bonomo 2005).

Para que uma beta-lactamase possa conferir resistência a um antimicrobiano beta-lactâmico vários fatores são importantes tais como: a sua localização, a sua cinética, as condições físico-químicas, a velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria, a quantidade de enzima produzida, a afinidade do antimicrobiano pela beta-lactamase e a sua concentração na célula bacteriana (Livermore 1991, Sanders 1992, Livermore 1995, Medeiros 1997).

A localização das beta-lactamases varia de acordo com a espécie bacteriana. Nas Gram-positivas, são secretadas para o meio extracelular, tornando-as menos ativas do que as enzimas produzidas por bactérias Gram-negativas, as quais se localizam no espaço periplasmático, onde alcançam maiores concentrações (Livermore 1995).

As beta-lactamases de espectro expandido (ESBL) são enzimas mediadas por plasmídios e que conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, tais como cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e monobactâmicos. Outra característica fenotípica importante dessas enzimas, é que são sensíveis à ação dos

inibidores de beta-lactamases, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam (Phillipon et al. 1989, Phillipon, Lábia, Jacoby 1989, Bush & Singer 1989, Jacoby & Medeiros 1991). A emergência desse tipo de beta-lactamase provavelmente seja conseqüência da pressão seletiva causada pelo grande uso indiscriminado das cefalosporinas de amplo espectro (Naumovski et al. 1992, Meyer et al. 1993).

As ESBLs são freqüentemente isoladas em espécies de enterobactérias, como *E. coli* e *K. pneumoniae* (Livermore 1995). A produção de ESBL entre amostras de *Klebsiella* está relacionada presença de plasmídios e tem se tornado um problema na erradicação de microrganismos resistentes. O primeiro relato de produção de ESBL foi em *K. pneumoniae*, logo depois foi descrito que *E. coli* e ocasionalmente outra *Enterobacteriaceae* também produzia ESBL. Entretanto, *K. pneumoniae* e *E. coli* continuam sendo as principais espécies produtoras de ESBL (Romero et al. 2005).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

- Identificar bioquimicamente os bastonetes Gram-negativos isolados;

- Avaliar a prevalência de bastonetes Gram-negativos na nasofaringe de crianças menores de cinco anos de idade que freqüentam creches do município de Goiânia-Goiás;

- Determinar o perfil de suscetibilidade dos bastonetes Gram-negativos aos antimicrobianos;

- Detectar a produção fenotípica de beta-lactamase de espectro ampliado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Área e população de estudo

O estudo utilizou a estrutura do sistema de vigilância prospectiva populacional de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* em crianças de 62 creches do município de Goiânia. O município de Goiânia consta com uma população de 1.220.412 habitantes, utiliza uma divisão territorial composta por nove distritos sanitários (DS) para administração dos serviços e planejamento em saúde (IBGE 2006). A amostragem dos isolados de BGN foi ponderada pela proporção de crianças de 2 a 59 meses em cada DS, sendo que para cada DS foram sorteadas as creches para o recrutamento de crianças até atingir o tamanho da amostra estabelecido para cada DS. O tamanho da amostra foi estabelecido em virtude da prevalência e resistência dos isolados. Foram coletados 1192 *swabs* de nasofaringe de crianças, estimando-se prevalência de portador de BGN de 30% com resistência de até 30% e erro de 5%. Esse tamanho da amostra foi calculado levando em conta um poder estatístico de 80% para detectar medidas de associação maior que 2,0 (*odds ratio*, razão de prevalência).

3.2. Coleta e Transporte

As coletas de espécimes da nasofaringe foram realizadas após consentimento informado por escrito dos pais ou responsáveis e posterior preenchimento de questionário. O protocolo de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) atendendo à resolução 196/96. As amostras foram obtidas utilizando um transwab (*Transwab Medical Wire & Equipment Corsham, UK*) ultrafino e flexível em uma das narinas da criança, até aproximadamente 2/3 da distância do nariz ao lóbulo da orelha, na direção horizontal, até encontrar um ponto de resistência. Na parede posterior da nasofaringe, movimentos giratórios lentos foram aplicados com o transwab que em seguida foi removido e inoculado no meio para transporte (meio modificado de Stuart – *Medical Wire & Equipment Corsham, UK*). Posteriormente, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da