

OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS ESTRITOS NO ESCARRO DE PACIENTES COM BRONQUITE CRÔNICA *

Jorge R. Spitz ** e Wilson Chagas de Araújo ***

No escarro de pacientes hospitalizados com bronquite crônica foram isolados microrganismos anaeróbios estritos — Fusobacterium, Veillonella, Bacteroides melaninogenicus, Peptostreptococcus, Actinomyces ou difteróides anaeróbios.

Como o isolamento de anaeróbios estritos foi realizado em alíquotas da diluição 10^{-3} do escarro fluidificado e em 83% dos casos não houve isolamento simultâneo no material do orofaringe, considera-se como de origem brônquica os anaeróbios isolados e não como contaminação do escarro no orofaringe e cavidade oral.

A bronquite crônica é doença comum e das mais importantes do aparelho respiratório. Sua etiologia é discutida, embora vários microrganismos possam ser isolados da expectoração presente.

Exames bacteriológicos sucessivos, do escarro colhido de pacientes com bronquite crônica, têm mostrado certa variação qualitativa e/ou quantitativa de microrganismos entre pacientes e em um mesmo paciente.

Embora sejam isolados, com regularidade, microrganismos da complexa microbiota normal do orofaringe e cavidade oral, o exame bacteriológico do escarro é importante pela possibilidade de isolamento de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos, como *Haemophilus influenzae*, pneumococo, estreptococos do grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* e o bacilo de Friedlander (13).

Numerosos trabalhos foram realizados para conhecimento dos microrganismos pre-

sentes no escarro de pacientes com doença respiratória crônica, empregando-se meios nutritivos seletivos e não seletivos, incubados exclusivamente em aerobiose, os quais possibilitaram o isolamento de várias espécies microbianas que poderão contribuir de alguma forma para a instalação e evolução do quadro infeccioso (1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 12).

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de investigar a ocorrência de microrganismos anaeróbios estritos no escarro de pacientes com bronquite crônica, aproveitando o material colhido para o estudo de Alencar e cols. (1).

MATERIAL E MÉTODOS

De 27 pacientes, recém-internados com diagnóstico de bronquite crônica, no Serviço de Pneumologia, da Policlínica Geral do Rio de Janeiro (sob a orientação do Prof. Edmundo Blundi), e que não haviam iniciado a antibioticoterapia, foi colhido es-

* Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia Oral, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., com auxílio do CNPq e CEPG da U.F.R.J.

** Acadêmico da Faculdade de Medicina da U.F.R.J. — Bolsista do CEPG da U.F.R.J.

*** Pesquisador-Conferencista do CNPq.

carro em placas de Petri esterilizadas, antes da primeira alimentação. Material do orofaringe foi colhido com mecha de algodão esterilizada, que era esfregada vigorosamente sobre as amígdalas ou pilares posteriores. Parte do escarro foi fluidificada com igual quantidade da solução de N-acetil-l-cisteína* à 20% em salina tamponada, seguindo-se diluições decimais em tampão de fosfato com redutor (6) até a concentração 10⁻³. A mecha de algodão era introduzida em 3,0 ml de "Brain Heart Infusion", para emulsionar o material, agitando-se durante 30 seg. no Vortex Super Mixer (Lab-Line Instruments Inc.) para homogeneização. Com auxílio de alça de platina, de aproximadamente 5 mm de diâmetro, carregada com a emulsão do material do orofaringe, com escarro e com diluições do escarro lisado, as seguintes inoculações foram realizadas: 1) por esgotamento, na superfície do meio de McCarthy & Snyder (11), para isolamento de microrganismos do gênero *Fusobacterium*; 2) na superfície de agar-sangue, também por esgotamento, para isolamento de *Bacteroides melaninogenicus* e outros microrganismos anaeróbios (6); 3) em profundidade, no agar-lactato-vancomicina (14), para isolamento de *Veillonella*. Todas as placas foram incubadas à 37°C em jarra tipo Brewer, com 95% de nitrogênio e 5% de gás carbônico.

Após 7 dias de incubação, as placas foram examinadas com auxílio de microscópio estereoscópico (aumento 32 x), com luz refletida: 1) nas placas de McCarthy & Snyder, as colônias iridescentes de bastonetes gram negativos eram contadas como *Fusobacterium* (2); 2) nas placas de agar-lactato-vancomicina, as colônias isoladas na massa do agar, com morfologia de "disco voador", de cocos gram negativos, eram contadas como *Veillonella*; nas placas de agar sangue, as colônias com pigmento negro foram contadas como *B. melaninogenicus*; nas placas inoculadas com escarro lisado e material do orofaringe, as colônias com mesma morfologia eram contadas, e algumas representativas de cada tipo colonial foram inoculadas em meio de tioglicolato para estudo posterior da morfologia e tipo respiratório. Os tubos de tioglicolato foram também incubados em anaerobiose, conforme descrição anterior; após 4 dias,

as culturas foram examinadas em esfregaços corados pelo gram, seguindo-se a sementeira na superfície do agar sangue, em duplicata, incubando-se a 37°C uma placa em anaerobiose e a outra em aerobiose. As culturas de cocos e bacilos gram positivos eram consideradas anaeróbias estritas, quando havia crescimento de colônias somente na placa de agar sangue incubada na jarra de Brewer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do isolamento de microrganismos anaeróbios estritos no escarro (integral e lisado) e no orofaringe de pacientes com bronquite crônica estão condensados nas Tabelas 1 e 2.

Em 12 casos houve isolamento de microrganismos anaeróbios estritos a partir do escarro lisado e diluído em tampão redutor, representando aproximadamente 44,4% dos pacientes examinados. Considerando que cerca de 0,01 ml do escarro, homogeneizado em igual quantidade da solução fluidificadora, foi inoculado nos meios nutritivos, os resultados da Tabela 1 poderão indicar a ocorrência dos microrganismos anaeróbios na quantidade de 10⁴ microrganismos por mililitro de escarro.

Os recursos laboratoriais utilizados não permitiam isolar grande variedade de microrganismos anaeróbios. Entretanto, definindo-se o trabalho como sondagem preliminar sobre a ocorrência de anaeróbios estritos no escarro, os recursos parecem suficientes, porque foram aplicados dois meios seletivos, para *Fusobacterium* e para *Veillonella*, que dispensam caracterização posterior dos microrganismos isolados, além do reconhecimento fácil do *Bacteroides melaninogenicus* nas placas de agar sangue somente pela coloração negra de suas colônias. A ocorrência de outros microrganismos anaeróbios estritos foi investigada de maneira sumária, a partir das placas de agar sangue, contando-se as colônias representativas de um tipo colonial e utilizando-se algumas para determinação do tipo respiratório. Assim, apesar da limitação do recurso de estudar colônias representativas, em quatro casos foram isolados cocos gram positivos anaeróbios estritos, provavelmente do gênero *Peptostreptococcus*, e, em outros quatro pacientes, foram isolados bastonetes gram positivos anaeróbios que

* FLUIMUCIL do Zambon Laboratórios Farmacêuticos S.A.

poderiam ser *Actinomyces* ou "difteroides" anaeróbios.

Como a sondagem realizada indicou a ocorrência de anaeróbios estritos no escarro de pacientes com bronquite crônica, será oportuno, em outro estudo envolvendo maior número de pacientes, caracterizar todos os microrganismos isolados no agar sangue, com aplicação de testes bioquímicos e provas que explorem a fisiologia microbiana, para aumentar as possibilidades de identificação de maior variedade microrganismos anaeróbios estritos.

Apenas um caso, dos 12 que permitiram isolar microrganismos anaeróbios estritos, apresentava simultaneamente dois microrganismos anaeróbios. Parece oportuno ressaltar que, em todos os casos (negativos ou positivos para anaeróbios) estavam presentes alguns dos 17 microrganismos facultativos isolados do mesmo escarro por Alencar e cols. (1). Aliás, a expectativa seria de se isolar maior variedade e maior quantidade de bactérias anaeróbias, considerando a infecção mista revelada preliminarmente por Alencar e cols. (1), na qual os microrganismos facultativos poderiam provocar o abaixamento do potencial de oxiredução a nível que poderia garantir o desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios estritos.

O escarro contamina-se com a microbiota da cavidade oral, e, principalmente, com a do faringe, conforme demonstraram Laurenzi e cols. (8): a cavidade oral ou faríngea de vários pacientes foi contaminada com *Serratia marcescens*, cujo pigmento vermelho revela a presença do microrganismo dispensando outros testes de caracterização; quando a cavidade oral era contaminada, *Serratia* era isolado do escarro, apesar de várias lavagens (3 a 9) do material com salina fisiológica estéril; quando a contaminação ocorria no faringe, o microrganismo pigmentado era ainda isolado apesar de 9 lavagens com salina.

Segundo Brumfitt e cols. (3), a bacteriologia do escarro, apesar dos escrupulosos cuidados com a colheita e manipulação do material, parece um guia pouco adequado para estudo da bacteriologia da árvore brônquica, porque o escarro pode se contaminar com os microrganismos presentes nas secreções do trato respiratório superior.

Com esta preocupação, no presente trabalho, o escarro foi homogeneizado e diluído em tampão redutor, até a concentração

10-3, interpretando-se que o isolamento de microrganismos anaeróbios estritos no material, por exemplo, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *B. melaninogenicus* e/ou outros anaeróbios, não poderia ser decorrente de contaminação do escarro na passagem pela cavidade oral.

Os resultados do presente trabalho (Tabelas 1 e 2) discordam das conclusões de Laurenzi e cols. (8) quando consideraram que só raramente os microrganismos isolados do escarro não são também isolados do orofaringe, pois apenas em 2 casos (17%) os microrganismos anaeróbios, isolados do escarro lisado, foram também isolados do orofaringe. Entretanto, não está afastada a possibilidade da relação considerada por Laurenzi e cols. (8) limitar-se unicamente aos microrganismos facultativos estudados por aquele autor.

Brumfitt e Willoughby (4), estudando, durante 2 anos, escarro e material do orofaringe de 117 pacientes com doenças respiratórias crônicas, concluíram que — 1) cerca da metade dos casos com microrganismos patogênicos no escarro apresentava os mesmos microrganismos no orofaringe; 2) quando os microrganismos eram isolados do escarro, porém estavam ausentes no orofaringe, podiam ser considerados como originários dos brônquios. Analisando os resultados do presente trabalho, podemos admitir que, em 83% (10 casos) dos isolamentos, a fonte dos microrganismos anaeróbios estritos seria o trato respiratório inferior, desde que não houve isolamento simultâneo dos mesmos microrganismos no orofaringe.

Os resultados da presente sondagem estimulam a realização de pesquisa mais ampla sobre a ocorrência de microrganismos anaeróbios estritos no escarro de pacientes com doença respiratória crônica, examinando-se maior número de pacientes e ampliando-se os recursos para isolamento e caracterização de anaeróbios estritos. Na oportunidade, será interessante estudar a possível influência da higiene oral deficiente sobre a microbiota encontrada, considerando os resultados de Potter e cols. (12) que mostraram que 25% dos pacientes com microrganismos patogênicos nos brônquios apresentavam dentes infectados, contrastando com 7,5% dos pacientes que não apresentavam microrganismos patogênicos nos brônquios embora apresentassem dentes infectados.

TABELA I — Isolamento de microrganismos anaeróbios do escarro e orofaringe de 27 pacientes com bronquite crônica.

MICROORGANISMOS	MATERIAL	ESCARRO		MATERIAL DO OROFARINGE
		LISADO	INTEGRAL	
<i>FUSOBACTERIUM</i>		2* (1-4)**	0	0
<i>VEILONELLA</i>		1 (2)	3	12
<i>B. MELANINOGENICUS</i>		2 (6-9)	2	4
COCOS G + ANAE.		4 (2-14)	—	2
BACIOS G + ANAE.		4 (1-34)	—	0

* Número de casos.

** Limites do número de colônias.

TABELA II — Dados complementares sobre o isolamento de microrganismos anaeróbios estritos do escarro e orofaringe de 27 pacientes com bronquite crônica.

Ausência de anaeróbios nos 3 materiais	5
Isolamento de anaeróbios no lisado	12
Isolamento simultâneo de 2 anaeróbios no lisado	1
Isolamento simultâneo no lisado e escarro integral	3
Isolamento do mesmo anaeróbio no lisado e escarro integral	0
Isolamento simultâneo no escarro integral e orofaringe	3
Isolamento do mesmo anaeróbio no escarro integral e orofaringe	2

SUMMARY

Strict anaerobic microorganisms (Fusobacterium, Veillonella, Bacteroides melaninogenicus, Peptostreptococcus, Actinomyces or anaerobic "diphtheroids") were isolated from expectorated sputum of hospitalized patients with chronic bronchitis.

It is noteworthy that the anaerobic microorganisms were isolated from 10⁻³ dilution of fluidified sputum and were not recovered from pharyngeal cultures in 83% of the isolates.

These results indicate the bronchial origin of the strict anaerobic microorganisms and can not borne out the conclusion that sputum was contaminated with the anaerobic bacteria in pharynx and oral cavity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENCAR, N. & cols. — Bacteriologia das bronquites crônicas. Resumo dos trabalhos do III Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1971, p. 17.
2. ARAÚJO, WILSON CHAGAS DE & cols. — Rendimento dos meios seletivos para bactérias do gênero *Fusobacterium*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2: 247-253, 1968.
3. BRUMFITT, W. & cols. — An evaluation of sputum examination in chronic bronchitis. Lancet, 2: 1.306-1.309, 1957.
4. BRUMFITT, W. & WILLOUGHBY, M. L. N. — Laboratory differentiation of chronic bronchial disease (An investigation of 117 cases). Lancet, 1: 132-134, 1958.
5. DO. WLING, H. F. & cols. — Bacteriologic studies of the sputum in patients with chronic bronchitis and bronchiectasis. Am. Rev. Resp. Dis., 81: 329-339, 1960.
6. GIBBONS, R. J. & cols. — The microbiota of gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms. Archs Oral Biol., 8: 281-289, 1963.
7. KILBOURN, J. P. & cols. — Quantitative bacteriology of sputum. Am. Rev. Resp. Dis., 98: 810-818, 1968.
8. LAURENKI, G. A. & cols. Bacteriologic flora of the lower respiratory tract. New Engl. J. Med., 265: 1.273-1.278, 1961.
9. LEES, A. W. & MCNAUGHT, W. — Bacteriology of lower-respiratory-tract secretion, sputum and upper-respiratory-tract secretions in "normais" and chronic bronchitis. Lancet, 2: 1.112-1.115, 1959.
10. MAY, J. R. — The bacteriology of chronic bronchitis. Lancet, 2: 1.206-1.207, 1952.
11. MCCARTHY, C. & SNYDER, M. L. — Selective medium for fusobacteria and *Leptotrichia*. J. Bacteriol., 86: 158-159, 1963.
12. POTTER, R. T. & cols. — The bacteriology of the lower respiratory tract (bronchoscopic study of 100 clinical cases). Am. Rev. Resp. Dis., 97: 1.051-1.061, 1968.
13. PULASKI, E. J. — Common Bacterial Infections (Pathophysiology and Clinical management), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1964.
14. ROGOSA, M. — A selective medium for the isolation and enumeration of the *Veillonella* from the oral cavity. J. Bacteriol., 76: 455-456, 1958.