

Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on *Staphylococcus aureus*

Colonização microbiana precoce de pacientes identificados por triagem neonatal para fibrose cística, com ênfase em *Staphylococcus aureus*

Helena A. P. H. M. Souza¹, Keite S. Nogueira¹, Adriana P. Matos¹, Ricardo P. Vieira², Carlos A. Riedi¹, Nelson A. Rosário³, Flávio Q. Telles³, Libera M. Dalla Costa³

Resumo

Objetivos: Avaliar prospectivamente a colonização bacteriana de pacientes com fibrose cística identificados por triagem neonatal. Avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos e caracterizar molecularmente as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas da orofaringe dos pacientes no período do estudo.

Métodos: Foram estudados 25 pacientes com fibrose cística, identificados por tripsina imunorreativa e com diagnóstico confirmado por duas ou mais provas de suor, atendidos regularmente no ambulatório de fibrose cística do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Foram coletadas amostras de orofaringe com swab e cultivadas por métodos rotineiros; as colônias bacterianas foram identificadas fenotipicamente e testadas quanto à suscetibilidade a antimicrobianos. Os isolados de *S. aureus* foram submetidos a tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado.

Resultados: De um total de 234 amostras de orofaringe, *S. aureus* foi isolado em maior número (76% dos pacientes, 42% das amostras), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (36% dos pacientes, 16% das amostras) e *Haemophilus* spp. (76% dos pacientes; 19% das amostras). Dos 19 pacientes colonizados com *S. aureus*, foram obtidos 73 isolados, 18 oxacilina-resistentes (24,6%), isolados de dois pacientes, com perfis eletroforéticos idênticos ao do clone brasileiro. Os demais isolados oxacilina-sensíveis distribuíram-se entre 18 perfis eletroforéticos distintos.

Conclusão: Observou-se uma maior prevalência de *S. aureus*, com isolamento mais precoce em relação aos outros patógenos pesquisados. Os isolados multissensíveis distribuíram-se em clones distintos, caracterizando a não transmissibilidade entre as cepas comunitárias. Os *S. aureus* resistentes a oxacilina isolados apresentaram perfis eletroforéticos idênticos, provavelmente adquiridos no ambiente hospitalar. *P. aeruginosa* foi pouco frequente na população estudada.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(5):377-82: Fibrose cística, microbiologia, epidemiologia.

Abstract

Objectives: To assess bacterial colonization prospectively in patients with cystic fibrosis identified by neonatal screening. To assess susceptibility to antimicrobials and to perform the molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the oropharynx of patients during the study.

Methods: Twenty-five cystic fibrosis patients receiving regular treatment at the Cystic Fibrosis Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná, Brazil, were included in the study. All patients were identified by trypsin-like immunoreactivity and their diagnosis was confirmed by two or more sweat tests. Oropharyngeal swabs were collected and cultured according to routine methods; bacterial colonies were phenotypically identified and their susceptibility to antimicrobials was tested. *S. aureus* isolates were submitted to molecular typing using pulsed-field gel electrophoresis.

Results: Out of 234 oropharyngeal swabs, *S. aureus* was the most frequently isolated strain (76% of patients, 42% of swabs), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (36% of patients, 16% of swabs) and *Haemophilus* spp. (76% of patients; 19% of swabs). Seventy-three isolates were obtained from 19 patients colonized with *S. aureus*, of which 18 were oxacillin-resistant (24.6%), isolated from two patients, with the same electrophoretic profiles as that of the Brazilian clone. The remaining oxacillin-sensitive isolates were distributed into 18 electrophoretic profiles.

Conclusion: There was higher prevalence of *S. aureus*, with earlier isolation than other pathogens. Multi-sensitive isolates were distributed into different clones, characterizing non-transmissibility among community-acquired strains. The isolated oxacillin-resistant *S. aureus* showed identical electrophoretic profiles, probably acquired in hospital. *P. aeruginosa* was not so frequent in the studied population.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(5):377-82: Cystic fibrosis, microbiology, epidemiology.

1. Mestre, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.
2. Professor substituto, UFPR, Curitiba, PR.
3. Doutor, UFPR, Curitiba, PR.

Fontes financiadoras: Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba (NEBaC), United Medical e Newprov Produtos para Laboratório Ltda.

Artigo submetido em 27.10.05, aceito em 12.07.06.

Como citar este artigo: Souza HA, Nogueira KS, Matos AP, Vieira RP, Riedi CA, Rosário NA, et al. Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on *Staphylococcus aureus*. J Pediatr (Rio J). 2006;82:377-82.

Introdução

Fibrose cística (FC) é a mais frequente doença genética fatal, acometendo principalmente indivíduos caucásicos¹. É causada por mutações no gene CFTR, provocando alterações na viscosidade do muco das vias aéreas e induzindo à infecção endobrônquica crônica, que será responsável pela evolução fatal de praticamente todos os pacientes². A principal causa de óbito nessa doença é a infecção e inflamação provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*, o agente infeccioso mais comum¹. Alguns autores têm levan-

tado a hipótese de que a infecção por *Staphylococcus aureus* proporciona um *milieu* favorável à aderência e instalação de *P. aeruginosa* nas vias aéreas dos pacientes com FC³. Entretanto, não há estudos longitudinais publicados no Brasil sobre a colonização e dinâmica da infecção por *S. aureus* nessa população.

A inclusão da pesquisa da doença no programa de triagem neonatal (teste do pezinho) no estado do Paraná em setembro de 2001 identificou diversos casos que provavelmente seriam diagnosticados tardiamente, após o insucesso do tratamento de infecções pulmonares recorrentes. A partir do diagnóstico precoce da FC, pode-se instituir tratamento adequado e, com isso, melhorar o prognóstico dos pacientes⁴. Este estudo foi idealizado com o objetivo de avaliar a evolução da colonização microbiana precoce em pacientes com FC diagnosticados pela triagem neonatal, em especial para verificar o potencial de transmissibilidade de *S. aureus* entre os pacientes.

Métodos

O trabalho teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). O HC e todos os responsáveis pelas crianças concordaram em participar. Foram coletados *swabs* de faringe posterior das crianças com FC, identificadas pela triagem neonatal (tripsina imunorreativa) e com confirmação diagnóstica por duas ou mais provas de suor⁵. Foram incluídos no estudo 25 pacientes atendidos regularmente no ambulatório de fibrose cística do HC-UFPR, entre agosto de 2003 e dezembro de 2004. As coletas ocorreram com a frequência de atendimento estabelecida de acordo com a evolução clínica de cada paciente. Os pacientes analisados tinham média da idade de 14,3 meses para os meninos e 15,5 meses para as meninas. Para avaliação estatística dos dados, foi realizada análise descritiva (cálculo de média, mediana e intervalo de confiança).

O material biológico (*swab*) foi transportado em tubos com 1 mL de tampão PBS contendo 0,1% de gelatina bacteriológica, em caixa isotérmica⁶. Na chegada do material ao laboratório, as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 30 s e inoculadas com alça calibrada de 10 µL (0,01 mL) em três placas com diferentes meios de cultura, ágar-sangue (AS), ágar chocolate suplementado (ACH) e ágar MacConkey (MC), de maneira a propiciar avaliação semiquantitativa do crescimento bacteriano⁷. As placas foram incubadas à temperatura e atmosfera usuais.

As colônias suspeitas das bactérias classicamente isoladas nesta amostra de pacientes, como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *H. influenzae*, foram identificadas utilizando os métodos de rotina adotados pela Seção de Bacteriologia do Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR^{8,9}. Os mesmos isolados foram submetidos a teste de suscetibilidade pelo método clássico de disco-difusão (Kirby Bauer)¹⁰. As amostras bacterianas de interesse foram suspensas em solução para criopreservação (caldo infuso de cérebro e coração com 15% de glicerol) e armazenadas a -80 °C para testes complementares que seriam posteriormente realizados em conjunto¹¹. Os testes confirmatórios para identificação

definitiva de *S. aureus* após reativação dos isolados armazenados incluíram: hemólise em ágar-sangue de carneiro, prova da coagulase ligada, crescimento em ágar contendo 7,5% de cloreto de sódio, fermentação do manitol, pigmentação das colônias e atividade da desoxirribonuclease, seguindo técnicas padronizadas¹².

O teste de suscetibilidade para verificação da concentração inibitória mínima (CIM) de todos os isolados de *S. aureus* armazenados foi realizado pelo método de diluição em ágar, frente a diferentes concentrações de ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina¹³. Sessenta e cinco isolados obtidos com mais de 15 dias de intervalo para um mesmo paciente foram encaminhados ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), em São Paulo, para tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Para a corrida eletroforética, foi utilizado gel de agarose ultrapur a 1%, voltagem de 6,0 volts/cm, pulso inicial de 5,0 s e final de 60 s e tempo de corrida de 23 horas. A técnica consiste na análise do polimorfismo de fragmentos de DNA total após digestão por endonucleases que reconhecem sítios infreqüentes no genoma bacteriano¹⁴.

Resultados

Foram coletadas 234 amostras de orofaringe de um total de 25 crianças (48% do sexo masculino e 52% do sexo feminino), com média de 9,3 amostras por paciente. A frequência das consultas variou de 15 dias a 3 meses, com média de 53 dias. O isolamento de patógenos respiratórios (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e complexo *B. cepacia*) ocorreu em 100 amostras (42,73%) obtidas dos 25 pacientes, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Proporção de amostras positivas para as bactérias de interesse em fibrose cística

Bactéria	Pacientes	Amostras positivas/paciente
<i>S. aureus</i>	19 (76%)	39,7 %
<i>H. influenzae</i>	19 (76%)	18,7 %
<i>S. pneumoniae</i>	16 (64%)	13,2 %
<i>P. aeruginosa</i>	9 (36%)	15,6 %
<i>B. cepacia</i>	1 (4%)	11,7 %

O primeiro patógeno isolado foi *S. aureus* em 18 pacientes (72%) e *H. influenzae* em 10 pacientes (40%); em quatro pacientes (16%), esses dois patógenos foram isolados concomitantemente na primeira cultura. *P. aeruginosa* foi o primeiro patógeno a ser isolado em somente dois pacientes (8%) e, em um deles, foi isolado concomitantemente *S. aureus*. O tempo médio decorrido até o primeiro isolamento de *S. aureus* foi de 214 dias, com intervalo de confiança de 120 a 309 dias. Para o primeiro isolamento de *P. aeruginosa*, decorreu o tempo médio de 358 dias, com intervalo de confiança de 164 a 553 dias.

Dos 19 pacientes colonizados com *S. aureus*, obteve-se 73 isolados, dos quais 18 (24,6%) eram oxacilina-resistentes (MRSA), obtidos de três pacientes; em dois deles, a maioria dos isolados (13/14 e 4/6) tinha essa característica e, no outro paciente, em apenas um de três isolados. A maior taxa de amostras positivas por paciente foi verificada com essa bactéria (37,23%, com variação 10 a 82,35%).

Foram obtidos 15 isolados de nove pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, todos multissensíveis e não-mucóides. Do total de pacientes, seis foram anteriormente colonizados com *S. aureus*, e dois com outros patógenos (um com *H. influenzae* e outro com *Streptococcus pneumoniae*). Nenhum paciente apresentou colonização persistente por *P. aeruginosa*. Nas amostras positivas para essa bactéria, havia concomitantemente *Haemophilus spp.*, *S. aureus* MRSA e oxacilina-sensíveis (MSSA), e em oito amostras não havia outro patógeno. A média de amostras positivas por paciente foi de 15,6%, com intervalo de confiança de 0 a 43,5%.

Haemophilus spp. estava presente em 19 pacientes, totalizando 33 isolados, sendo que em nenhum deles de maneira persistente. A média de amostras positivas por paciente foi de 18,7%, com intervalo de confiança de 0 a 37,5%.

Dos 16 (64%) pacientes colonizados por *S. pneumoniae*, foram obtidos 20 isolados, sendo que 18 foram testados para sensibilidade à penicilina. Treze foram resistentes (72%) e cinco sensíveis na prova do disco de oxacilina e confirmação com *E-test* para penicilina. Nenhum paciente apresentou colonização persistente por *S. pneumoniae*.

Obtiveram-se dois isolados do complexo *B. cepacia* de um mesmo paciente em amostras consecutivas. Uma vez que o objetivo do estudo não era caracterizar molecularmente todos os microrganismos isolados, não foi determinada a subespécie genômica (genomovar). O paciente era colonizado persistentemente com MRSA e não apresentou a bactéria nas culturas subsequentes.

S. maltophilia e *A. xylosoxidans* não foram isolados nas amostras estudadas.

Em 69 isolados de *S. aureus*, analisou-se o perfil bioquímico (biotipo) e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (antibiotipo).

De 18 pacientes colonizados, quatro tinham apenas um isolado cada e, portanto, foram excluídos desta análise preliminar. Dos demais, 10 apresentaram mais da metade dos seus isolados com biotipos e antibiogramas sugerindo pertencerem ao mesmo clone, e outros quatro tinham isolados com perfis diferentes, seja quanto ao biotipo ou ao antibiograma.

A determinação das CIM dos antibióticos testados frente aos isolados de *S. aureus* demonstrou que todos apresentaram elevada potência, com CIM₅₀ abaixo dos pontos de corte para sensibilidade. Vancomicina foi o mais ativo, com CIM₉₀ abaixo desse valor, enquanto os outros antimicrobianos testados apresentaram valores acima do ponto de corte para resistência (Tabela 2). Analisando-se os resultados, vancomicina mostrou-se ativo contra todas as cepas testadas (100%), enquanto os outros agentes apresentaram suscetibilidades variando de 64,2 a 76,1%.

Os 65 isolados de *S. aureus* submetidos a tipagem molecular por PFGE foram analisados segundo os critérios recomendados por Tenover et al.¹⁵, apresentando 21 perfis eletroforéticos distintos. Os isolados de MRSA foram comparados com o clone brasileiro de MRSA na mesma análise (Figura 1). Os MRSA obtidos de dois pacientes (10 de um paciente e três do outro) apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone brasileiro. Um outro isolado de MRSA, distinto dos pacientes já citados, foi obtido em somente uma amostra de um terceiro paciente, sendo desconsiderado. Os demais isolados, todos MSSA, distribuíram-se entre 18 perfis eletroforéticos (Figura 2).

Discussão

Os pulmões das crianças fibrocísticas são frequentemente colonizados ou infectados na primeira infância por bactérias como *S. aureus* e *H. influenzae*, as quais podem danificar o epitélio, levando ao aumento da aderência e substituição definitiva por *P. aeruginosa*¹. Esses dados corroboram a evolução da colonização bacteriana observada na amostra de pacientes analisada.

Um estudo envolvendo 639 pacientes de FC, menores de 18 anos de idade e registrados na Europa demonstrou que a profilaxia antiestafilocócica contínua aumentou o risco de

Tabela 2 - Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antibióticos frente às amostras de *S. aureus*

Antibiótico	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	% sensibilidade
Ciprofloxacino	< 0,5	> 16	73,5
Eritromicina	< 0,25	> 32	68,6
Gentamicina	< 1,0	> 64	64,2
Oxacilina	< 0,5	> 16	75,0
Sulfametoxazol-trimetoprim	< 19/1,0	> 304/16	76,1
Vancomicina	< 0,5	< 0,5	100,0

CIM = concentração inibitória mínima.

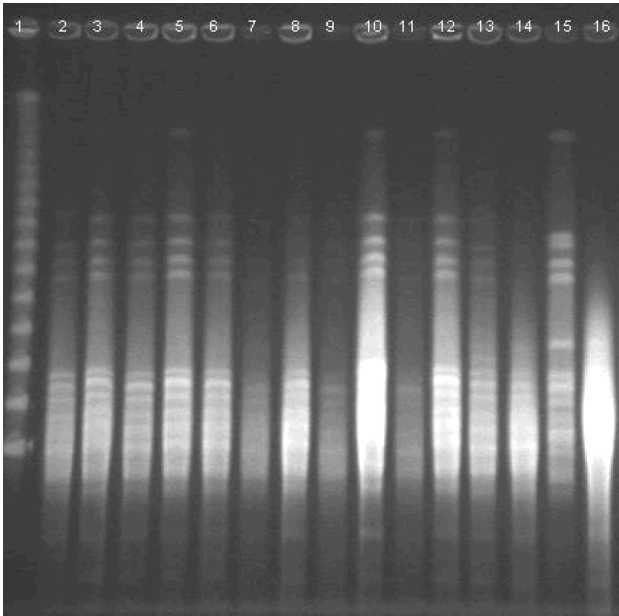


Figura 1 - Perfis eletroforéticos de MRSA isolados de três pacientes e do clone brasileiro

MRSA = *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

Linha 1: marcador de peso molecular; Linha 2: clone brasileiro de MRSA; Linhas 3 a 12: MRSA do paciente A (idêntico ao clone brasileiro); Linhas 13 a 15: MRSA do paciente B (idêntico ao clone brasileiro); Linha 16: MRSA do paciente C (distinto do clone brasileiro e dos isolados dos pacientes A e B).

colonização por *P. aeruginosa*, quando comparados com indivíduos que receberam terapia antibiótica contínua, intermitente ou nenhuma antibioticoterapia contra *S. aureus*¹⁶. Um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo concluiu que, apesar de o uso de profilaxia prolongada com cefalexina ter adiado a aquisição de *S. aureus*, por outro lado aumentou a colonização com *P. aeruginosa* e não apresentou benefício clinicamente significativo em crianças pequenas com FC¹⁷. Entretanto, a colonização crônica das vias aéreas na FC por *P. aeruginosa* é reduzida em regiões onde a terapia antiestafilocócica é administrada estritamente com base na necessidade, ao invés de profilaticamente¹⁸. Ainda não foram publicados estudos que demonstrem o efeito positivo do tratamento anti-*S. aureus* quando isolado em culturas de orofaringe.

A amostra de pacientes acompanhada neste estudo compreende crianças na primeira infância, variando de 1 mês a 3 anos de idade. O isolamento de *S. aureus* em 19 dos 25 pacientes (76% do total) e *Haemophilus* spp. na mesma proporção de indivíduos, embora em um número menor de amostras por paciente (18,7 contra 41,8% dos pacientes com *S. aureus*), está de acordo com os dados internacionais. Os pacientes que apresentavam *S. aureus* nas culturas foram tratados com dois antibióticos, por um período de 3 semanas, observando-se os resultados do antibiograma.

Antes do advento da antibioticoterapia, a maioria dos pacientes evoluía a óbito por infecção por *S. aureus*¹⁹. Atualmente, *P. aeruginosa* é o principal agente responsável pela infecção crônica, acometendo praticamente todos os

pacientes²⁰. A persistência de *S. aureus* há muito vem sendo relatada em infecções crônicas de pacientes jovens com FC²¹. Embora tendo avaliado uma população diferente quanto à idade e ao tipo de amostras coletadas, este estudo pode ser comparado ao de Kahl et al., que identificaram clones únicos e persistentes de *S. aureus* na maioria dos pacientes estudados²². A análise molecular realizada demonstrou que os pacientes colonizados por MSSA conservaram o mesmo clone durante todo o período, e que os clones eram exclusivos de cada paciente, caracterizando a não transmissibilidade das cepas.

O significado clínico da infecção por MRSA na FC ainda não foi estabelecido. Um estudo analisou crianças com a doença durante um período de 7 anos, cujas culturas de secreções respiratórias revelaram a presença de MRSA. Os autores concluíram que a infecção por esse tipo de bactéria em crianças com FC não afeta significativamente a função respiratória, mas tem um efeito adverso no crescimento. Os pacientes requerem antibióticos intravenosos em quantidade significativamente maior e têm maiores alterações radiológicas que os controles²³. Neste estudo, apenas duas crianças apresentaram infecção persistente com MRSA. Os pacientes apresentaram curvas ponderais constantemente abaixo do percentil 2,5, dados semelhantes aos de Miall et al.²³, embora nossa amostra tenha sido menor (dois pacientes *versus* 14 pacientes no estudo citado). Os dois pacientes com MRSA foram internados várias vezes desde o nascimento. Um apresentava cianose e saturação transcutânea de hemoglobina diminuída durante todo o período

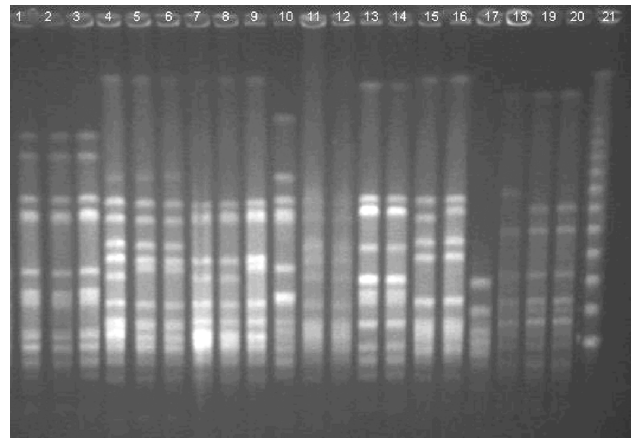


Figura 2 - Perfis eletroforéticos de MSSA isolados de seis pacientes

MSSA = *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*.

Linhas 1 a 3: isolados do paciente D (idênticos); Linhas 4 a 6: isolados do paciente E (o primeiro estreitamente relacionado aos outros dois, idênticos); Linhas 7 a 9: isolados do paciente F (os dois primeiros idênticos, e o terceiro estreitamente relacionado aos anteriores); Linhas 10 a 12: isolados do paciente G (o primeiro possivelmente relacionado aos dois seguintes, idênticos); Linhas 13 e 16: isolados do paciente H (os dois primeiros e os dois últimos idênticos, caracterizando dois clones distintos); Linhas 17 a 20: isolados do paciente I (o primeiro possivelmente relacionado aos três seguintes, estreitamente relacionados); Linha 21: marcador de peso molecular.

de seguimento, enquanto o outro teve íleo meconial, necessitando de tratamento cirúrgico logo nos primeiros meses de vida.

Os isolados de *P. aeruginosa* obtidos foram distintos das cepas geralmente observadas em pacientes fibrocísticos: sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados e não-mucóides. Burns et al. obtiveram resultados semelhantes em um estudo longitudinal abordando as alterações fenotípicas em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em uma coorte de 40 pacientes durante os 3 primeiros anos de vida²⁴.

Apesar do papel secundário de *S. pneumoniae* na infecção de pacientes com FC, a elevada proporção detectada de isolados resistentes à penicilina é indicativa do processo de seleção de mutantes pelo uso extensivo de antibióticos. Nenhum paciente foi persistentemente colonizado por *S. pneumoniae*, porém a alta prevalência do patógeno nas amostras cultivadas reforça a indicação da vacina para esse grupo de crianças.

Bactérias emergentes, como *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans*, não foram isoladas na população avaliada. Organismos pertencentes ao complexo *B. cepacia* foram pouco frequentes.

Os resultados observados permitiram demonstrar que *S. aureus* foi o primeiro patógeno isolado, a bactéria de maior ocorrência e com maior número de amostras positivas por paciente. Os isolados de MSSA testados mostraram-se sensíveis a ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina, porém o agente mais ativo foi vancomicina, com 100% de sensibilidade. A frequência de MRSA é preocupante, em razão da possibilidade de disseminação a outros pacientes com FC. As cepas de MRSA foram provavelmente adquiridas por infecção cruzada no ambiente hospitalar, visto que apresentaram perfil eletroforético idêntico ao do clone descrito por Sader, em 1994, e que vem sendo detectado na maioria dos hospitais brasileiros²⁵. As cepas de *S. aureus* sensíveis eram policlonais e exclusivas de cada paciente, indicando que provavelmente foram adquiridas dentro do círculo social próprio. Os isolados de *P. aeruginosa*, não-persistentes e com fenótipos não-mucóides e multissensíveis, pressupõem que a infecção é intermitente e não crônica. Uma menor sensibilidade das culturas de orofaringe no isolamento da bactéria pode ter sido responsável pelo baixo índice de isolamento observado, enfatizando a necessidade de se desenvolver técnicas mais sensíveis de detecção, como a pesquisa de anticorpos específicos²⁶ ou a reação em cadeia da polimerase²⁷.

Agradecimentos

Ao Dr. Grégor P. Chermikoski Santos, do Departamento de Pediatria da UFPR, pelos conhecimentos compartilhados durante o estudo.

Ao Dr. Ehrenfried O. Wittig e à Dra. Mouseline T. Domingos, do Laboratório de Pesquisas da Fundação Ecu-mênica de Proteção ao Excepcional (FEPE/PR), pelas análises realizadas.

Ao LEMC, pela prestação nas análises moleculares realizadas.

Referências

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:194-222.
2. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2003;361:681-9.
3. Govan JR, Nelson JW. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull.* 1992;48:912-30.
4. Farrell PM, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J, et al. Bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis after early or delayed diagnosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1100-8.
5. Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81:240-4.
6. Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL, et al. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:331-7.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberber PC, Winn WC Jr. Técnicas para o cultivo de amostras. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2001. p. 97-9.
8. Murray PR. *Manual of clinical microbiology.* 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003.
9. York MK. Aerobic bacteriology. In: Isenberg HD, editor. *Clinical microbiology procedures handbook.* 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2004. p. 3.1.1.-3.18.2.1.
10. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology.* 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 1108-27.
11. Reimer LG, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology.* 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 67-73.
12. Bannerman TM. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology.* 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 384-404.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S14. MIC Interpretive standards for Staphylococcus spp. Wayne: NCCLS; 2004
14. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications.* Totowa: Humana Press; 1998. p. 33-50.
15. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BA, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.
16. Ratjen F, Comes G, Paul K, Posselt HG, Wagner TOF, Harms K. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2001;31:13-6.
17. Stutman HR, Lieberman JM, Nussbaum E, Marks MI. Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *J Pediatr.* 2002;140:299-305.
18. Govan JRW, Doherty C, Glass S. Rational parameters for antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. *Infection.* 1987;15:300-7.
19. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child.* 1938;56:344-99.
20. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2001 annual report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation; 2002.
21. Hoiby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1982;301:33-54.
22. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haerberle J, Koch HG, Ritzfeld B, et al. Population dynamics of persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4424-7.
23. Miall LS, McGinley NT, Brownlee KG, Conway SP. Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 2001;84:160-2.

24. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis*. 1998;27:158-63.
25. Sader, HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1994;15:320-3.
26. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA*. 2002;287:2958-67.
27. da Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento SR, da Silva Ramos SR, Rozov T. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 1999;48:357-61.

Correspondência:

Helena A. P. Homem de Mello de Souza
Rua General Polli Coelho, 355
CEP 82800-180 – Curitiba, PR
Tel.: (41) 3360.7975 – Fax: (41) 3360.1811
E-mail: helenahms@onda.com.br