

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – PNEUMOLOGIA**

**O EXAME DIRETO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR PARA  
O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE PNEUMONIA NOSOCOMIAL:  
UM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**NILTON BRANDÃO DA SILVA**

**Porto Alegre, junho de 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – PNEUMOLOGIA**

**O EXAME DIRETO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR PARA  
O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE PNEUMONIA NOSOCOMIAL:  
UM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**NILTON BRANDÃO DA SILVA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina – Pneumologia, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em  
Medicina.**

**Orientador: Prof. Dr. José da Silva Moreira**

**Porto Alegre, junho de 2002**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Nilton Brandão da  
O exame direto do lavado broncoalveolar para o diagnóstico precoce de pneumonia nosocomial: um modelo experimental em ratos / Nilton Brandão da Silva; orient. José Moreira. Porto Alegre, 2002.  
159p. Tab. Graf. Il.

Tese ( Doutorado ) Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia.

1-Pneumonia. 2- Pneumonia nosocomial. 3- Pneumonia associada a ventilação mecânica. 4-Lavado broncoalveolar. 5-Bactéria fagocitada. 6-Bactéria intra-celular. 7-Pseudomonas aeruginosa I- Moreira, José. II- Título.

CDD : 616.241

Ruth Oliveira - CRB10/501



“La médecine expérimentale est donc la médecine qui a la prétension de connaître les lois de l’organisme sain et malade de manière non seulement à prévoir les phénomènes, mais aussi de façon à pouvoir les régler et les modifier dans certaines limites” (BERNARD, Claude. **Introduction à l’étude de la médecine expérimentale**, 1865).

Para Otávio e Ana Luiza,  
com o contínuo desejo de poder sempre estimular e fazer  
vicejar a chama revigorante da pesquisa.

Para Maria Luiza,  
de quem dependo visceralmente para poder fazê-lo, todos os  
dias, com toda a paixão necessária. Tal como me dizias  
outro dia:

Tudo conjeturas,  
pedaços,  
fragmentos,  
resíduos de imagens  
soltas  
à  
procura de novas composições,  
paisagens da alma:  
Recomeço aos quase 50...  
Continuamos quase aos 50

## **AGRADECIMENTOS**

Um trabalho de pesquisa nunca se faz sozinho. Ao contrário, ele representa o esforço integrado de uma série de profissionais dedicados e congregados pelo único interesse do crescimento pessoal, através do conhecimento científico e da pesquisa. No momento em que estamos concluindo esta fase do nosso trabalho, é por demais importante para mim deixar aqui expresso, de forma eloquente e afetiva, meu sincero e permanente reconhecimento a todos que permitiram, de uma forma ou de outra, a sua realização.

Ao Prof. JOSÉ DA SILVA MOREIRA, orientador, mestre e educador emérito, pela orientação sempre competente e segura deste trabalho e, em especial, pela condução qualificada do programa de Pós-Graduação em Pneumologia, a quem, alunos e pesquisadores, devemos-lhe incessante gratidão.

Ao Prof. PAULO GUERREIRO CARDOSO, companheiro de pesquisa no Laboratório Experimental de Pós-Graduação da FFCMPA e co-orientador dos aspectos técnicos, com decisiva contribuição para este trabalho, sua influência revitaliza nossa inclinação e sedução pela pesquisa experimental.

Ao Dr. JEAN CHASTRE, do Hôpital Bichat-Claude Bernard de Paris, agradeço pela leitura criteriosa e atenta do nosso trabalho e pelas valiosas contribuições para o curso da pesquisa, na pessoa de quem homenageamos a figura singular de Claude Bernard, pai da investigação experimental.

Ao Prof. BRUNO C. PALOMBINI, professor e amigo, pelo incentivo permanente pelo estudo e pela produção intelectual exemplar que lega a todos nós.

Ao Prof. NELSON DA SILVA PORTO, figura exponencial da medicina brasileira, de quem somos todos “filhos” designados a seguir o exemplo da sua contínua busca da verdade científica.

Meu agradecimento especial aos nossos acadêmicos bolsistas LUCAS MARTINS, JOSÉ ANFLOR JÚNIOR, CRISTIANO KOEFENDER, TIAGO TONIETTO, FREDERICO MARTINS e Dr. TULIO TONIETTO, exemplo de alunos e colegas competentes, além de trabalhadores incansáveis. Sem o convívio estimulante e construtivo de vocês seria impossível realizarmos este e outros tantos trabalhos.

Ao Prof. CICERO DIAS e seus alunos MARCOS V. ROPKE e ROSANE BUFFON, que sempre de forma solícita e competente, junto ao setor de Microbiologia da FFFCMPA, foram essenciais para evoluirmos na padronização dos modelos experimentais e leitura dos resultados microbiológicos.

À Dra. MIRIAM FRANZ, pelos competentes serviços prestados na leitura das lâminas, assim como ao Prof. JOÃO CARLOS PROLLA e funcionários do setor de Citologia do Instituto de Pesquisas Diagnósticas (IPD), que prontamente auxiliaram e colocaram a nossa disposição seu laboratório, fato fundamental para processamento das nossas amostras, nosso profundo agradecimento.

Aos Profs. Dra. MARINÊS BARRA, do Departamento de Patologista da FFFCMPA, e Dr. VINICIUS DUVAL do Setor de Citologia da FMUFRGS, pelo trabalho sério exaustivo e dedicado na leitura dos resultados histopatológicos e citológicos deste trabalho.

À Prof. MARI BOZZETTI, do Departamento de Epidemiologia da FMUFRGS, colega competente e conselheira, que trouxe inestimável auxílio e orientação sobre a análise e tratamento estatístico dos dados.

Agradeço também ao Prof. JORGE HETZEL, eminente Diretor da FFFCMPA, que sempre incentivou e procurou atender aos nosso apelos pela disponibilização dos recursos necessários para manter e desenvolver o Laboratório Experimental da nossa Faculdade.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FFFCMPA, em especial à sra. TERESINHA STEIN, exemplo de pessoa humana, cuja eficiência e contínuo entusiasmo em poder contribuir para a nossa pesquisa nos deixa definitivamente sensibilizados e agradecidos.

À Prof<sup>a</sup> MARIA DO HORTO SOARES MOTTA, pelo contato inteligente e instigante, agradecemos a competente orientação na redação final do trabalho.

À Sra. MARIA HELENA AMARAL CARDOZO agradecemos o trabalho incansável e solícito na digitação e no trabalho de editoração.

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE GRÁFICOS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS .....	16
RESUMO .....	18
SUMMARY .....	20
1 INTRODUÇÃO .....	24
1.1 Pneumonia Nosocomial e Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica .....	24
1.1.1 Epidemiologia, Importância Clínica e Etiologia .....	24
1.1.2 A Questão da Dificuldade Diagnóstica .....	30
1.1.3 Conseqüências da Dificuldade Diagnóstica .....	37
1.1.4 Evolução dos Critérios Diagnósticos Microbiológicos .....	38
1.2 Avaliação Crítica sobre as Diversas Técnicas Diagnósticas na Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica .....	41
1.2.1 Aspirado Traqueal .....	41
1.2.2 Escovado Brônquico Protegido .....	43
1.2.3 Lavado Broncoalveolar Broncoscópico .....	45
1.2.4 Lavado Broncoalveolar Não-Broncoscópico .....	49
1.3 Exame Direto do Lavado Broncoalveolar .....	51
1.3.1 Pesquisa da Bactéria Fagocitada Intracelular .....	51
1.3.2 Considerações sobre a Importância da Citologia do Exame do Escarro .....	59
1.4 Testes de Referência para o Diagnóstico de Pneumonia Nosocomial .....	62
1.5 Justificativa para o Estudo Experimental .....	66

2	OBJETIVOS E HIPÓTESES .....	70
2.1	Objetivos .....	70
2.1.1	Geral .....	70
2.1.2	Específicos .....	70
2.2	Hipóteses Gerais de Trabalho .....	71
3	METODOLOGIA .....	74
3.1	Fase I: Desenvolvimento e Padronização do Modelo Experimental de Pneumonia em Ratos – Observação dos Efeitos do Inóculo Bacteriano Comparados com os do Inóculo Estéril e Estudo da Viabilidade Diagnóstica através das Amostras Alveolares .....	75
3.1.1	Animal de Experimentação .....	75
3.1.2	Inóculo .....	75
3.1.3	Técnica de Inoculação Bacteriana Intrabrônquica .....	77
3.1.4	Período de Observação .....	77
3.1.5	Sacrifício dos Animais .....	78
3.1.6	Técnica do Lavado Broncoalveolar e Retirada dos Pulmões .....	78
3.1.7	Técnica de Processamento das Amostras do Lavado Broncoalveolar .....	79
3.1.8	Estudo Histopatológico .....	81
3.2	Fase II – Estudo Diagnóstico, Randomizado, Cego e Controlado do Lavado Broncoalveolar em Ratos Inoculados Tratados e Não-Tratados com Antibióticos .....	82
3.2.1	Grupos de Pneumonia Pneumocócica .....	83
3.2.2	Grupos de Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> .....	84
3.2.3	Variáveis Analisadas .....	84
3.3	Coleta de Dados e Tratamento Estatístico .....	85
4	RESULTADOS .....	90
4.1	Modelo Experimental .....	90
4.2	Pneumonia Pneumocócica e por <i>Pseudomonas</i> .....	94
4.2.1	Histopatologia .....	94
4.2.2	Microbiologia .....	97
4.3	Exame Direto do Lavado Broncoalveolar .....	99
4.3.1	Bactéria Fagocitada Intracelular e Bactéria Extracelular .....	99
4.3.2	Medida de Concordância na Leitura da Bactéria Intracelular .....	103
4.3.3	Celularidade do Lavado Broncoalveolar .....	103

5	DISCUSSÃO .....	123
6	CONCLUSÕES .....	140
7	BIBLIOGRAFIA .....	142
ANEXO	Descrição da Fase III: Estudo experimental do rendimento diagnóstico do lavado broncoalveolar na pneumonia em ratos com lesão pulmonar aguda primária induzida pela ventilação mecânica .....	157

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Taxas médias e por percentil 75 das pneumonias associadas à ventilação mecânica conforme o tipo de UTI – jan. 1995 a abr. 2000 – NNISS .....	25
QUADRO 2	Incidência e mortalidade das pneumonias adquiridas em ventilação mecânica .....	27
QUADRO 3	Agentes etiológicos das pneumonias nosocomiais em relação ao uso ou não de ventilação mecânica e taxas de mortalidade (Dados do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre) .....	29
QUADRO 4	Escore clínico de infecção pulmonar (CPIS), conforme Pugin e colaboradores .....	32
QUADRO 5	Critérios Diagnósticos de pneumonia associada ao respirador .....	36
QUADRO 6	Limiares apropriados para o tratamento com base nas culturas quantitativas em ufc/ml do lavado broncoalveolar .....	41
QUADRO 7	Análise do exame direto no lavado broncoalveolar .....	52
QUADRO 8	Resumo dos resultados de estudos sobre a BIC entre os principais autores .....	54

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Grupos de animais testados e seus principais resultados .....	92
TABELA 2	Comparação por médias e desvio padrão da diferença de peso corporal, consumo de água e alimento e volumes amostrais do lavado broncoalveolar entre os grupos tratado e não-tratado nos dois modelos de pneumonia .....	94
TABELA 3	Resultados das culturas quantitativas ( $10^3$ ufc/ml) do lavado broncoalveolar .....	99
TABELA 4	Sensibilidade, especificidade e valores preditivos da BIC a 2% em macrófagos .....	102
TABELA 5	Sensibilidade, especificidade e valores preditivos da BIC a 2% em neutrófilos .....	102
TABELA 6	Celularidade do lavado broncoalveolar entre os vários grupos .....	104
TABELA 7	Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para neutrófilos (50%) .....	104
TABELA 8	Dados sumarizados da BIC a 2% e culturas quantitativas (no limiar de $10^2$ ufc/ml) .....	106

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Percentual de área consolidada delimitada por morfometria nos dois modelos de pneumonia, mostrando maior extensão da área consolidada no modelo com <i>S. pneumoniae</i> , comparado ao com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	95
GRÁFICO 2	Comparação dos valores das culturas quantitativas em animais tratados com pneumonia pneumocócica .....	98
GRÁFICO 3	Comparação dos valores das culturas quantitativas em animais tratados para pneumonia por <i>Pseudomonas</i> .....	98
GRÁFICO 4	Comparação dos valores de BIC (%) em animais tratados para pneumonia por pneumococo .....	101
GRÁFICO 5	Comparação dos valores de BIC (%) em animais tratados para pneumonia por <i>Pseudomonas</i> .....	101

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Técnica do lavado broncoalveolar com duplo cateter sob anestesia ....	107
FIGURA 2	Bloco dos pulmões mostrando consolidação pneumônica no lobo inferior direito (visão posterior) .....	108
FIGURA 3	Técnica de morfometria para delimitação da área consolidada em cortes sagitais de pulmões corados por HE .....	109
FIGURA 4	Pulmão normal, coloração pela HE .....	110
FIGURA 5	Pneumonia pneumocócica em fase inicial, neutrófilos ao redor de vasos e capilares congestionados – HE .....	110
FIGURA 6	Pneumonia pneumocócica em fase inicial, com edema, neutrófilos perivascularares e capilares congestionados – HE .....	111
FIGURA 7	Pneumonia lobar pneumocócica, alvéolos com neutrófilos e capilares congestionados, fase de hepatização vermelha – HE .....	111
FIGURA 8	Pneumonia lobar pneumocócica em fase intermediária (fase 2) – HE	112
FIGURA 9	Pneumonia lobar pneumocócica em fase inicial, neutrófilos dentro de alvéolos e congestão capilar – HE .....	112
FIGURA 10	Pneumonia pneumocócica com focos confluentes (fase 3) – HE .....	113
FIGURA 11	Pneumonia pneumocócica, mostrando bronquíolo respiratório repleto de neutrófilos – HE .....	113
FIGURA 12	Pneumonia lobar pneumocócica, início da organização, com macrófagos alveolares em adição aos neutrófilos – HE .....	114
FIGURA 13	Pneumonia lobar pneumocócica – foco de hepatização cinzenta, alvéolos repletos de neutrófilos e hemácias – HE .....	114
FIGURA 14	Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> – vaso com infiltrado inflamatório – HE .....	115

FIGURA 15	Broncopneumonia focal por <i>Pseudomonas</i> em fase inicial – HE .....	115
FIGURA 16	Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> com bronquíolos e alvéolos repletos de neutrófilos – HE .....	116
FIGURA 17	Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> mostrando foco broncopneumônico com hemorragia – HE .....	116
FIGURA 18	Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> com foco de necrose e exsudato fibrinoso em fase 3 – HE .....	117
FIGURA 19	Pneumonia por <i>Pseudomonas</i> com foco de necrose, hemorragia e bactérias – HE .....	117
FIGURA 20	Pneumonia pneumocócica – coloração de Gram no tecido pulmonar, mostrando <i>S. pneumoniae</i> nas áreas consolidadas e periféricas .....	118
FIGURA 21	Pneumonia pneumocócica – coloração de Gram, para tecido pulmonar, mostrando a presença de alta densidade de <i>S. pneumoniae</i> no parênquima pulmonar .....	118
FIGURA 22	Exame direto do lavado broncoalveolar, coloração de Gram, mostrando <i>S. pneumoniae</i> no interior de neutrófilos e também extracelular (grande aumento e imersão em óleo) .....	119
FIGURA 23	Exame direto do lavado broncoalveolar, coloração de Gram, mostrando <i>P. aeruginosa</i> em neutrófilos e macrófagos (grande aumento, imersão em óleo) .....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT = aspirado traqueal

ATS = American Thoracic Society

BBS = Blind bronchial sampling ( amostra brônquica às cegas )

BEC = bactéria extracelular

BI = bacterial index ( índice bacteriano )

BIC = bactéria intracelular

CDCP = Centers of Disease Control and Prevention

CPIS = clinical pulmonary infection score ( escore clínico de infecção pulmonar )

DBPOC = doença broncopulmonar obstrutiva crônica

E = especificidade

FAPERGS = Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul

FFFCMPA = Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

HE = hematoxilina – eosina

IPD = Instituto de Pesquisas Biológicas

LBA = lavado broncoalveolar

LR = likelihood ratio ( razão de probabilidade )

miniLBA = minilavado broncoalveolar

MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NNISS = National Nosocomial Infection Surveillance System

PAVM = pneumonia associada à ventilação mecânica

PCR = polymerase chain reaction

LBAP = lavado broncopulmonar protegido

PMN = polimorfonucleares

PSB = protected specimen brush ( escovado brônquico protegido )

ROC = receiver operator characteristic

S = sensibilidade

SDRA = síndrome da distrição respiratória aguda

SEC = célula epitelial escamosa (squamous epithelial cell)

UTI = unidade de tratamento intensivo

VM = ventilação mecânica

VPN = valor preditivo negativo

VPP = valor preditivo positivo

## RESUMO

A pneumonia nosocomial é a principal causa de infecção nosocomial em unidades de tratamento intensivo e possui alta morbi/mortalidade. A incidência cumulativa varia, conforme os autores, entre limites amplos desde 8% até 51%, dependendo do tipo de paciente e do uso de instrumentação das vias respiratórias. Nos casos específicos das pneumonias de má resolução e da pneumonia associada à ventilação mecânica, o diagnóstico é problemático devido à ausência de uma padronização definitiva, decorrente não só da grande variabilidade fisiopatológica como também da pouca acurácia dos critérios clínicos, microbiológicos e radiológicos. Estes fatos ensejaram a utilização progressiva de técnicas invasivas sofisticadas para coleta de amostras respiratórias endobrônquicas. Entretanto, a validação dessas técnicas para uso sistemático depende ainda de estudos que avaliem não só o seu custo/benefício em cenários clínicos diversos como também a comparação de seu desempenho para o diagnóstico com um padrão-ouro histopatológico. Além disso, o rendimento das técnicas invasivas é freqüentemente limitado quando são aplicadas em pacientes sob antibioticoterapia, que constituem a maioria dos casos em unidades de cuidados intensivos. A otimização desses testes, discutindo suas indicações e avaliando sua capacidade técnica para a confirmação ou exclusão de pneumonia, é justificada pela necessidade da instituição precoce e correta do tratamento, pois disto resulta menor mortalidade, redução de custos e permanência no hospital. Entre os testes que podem auxiliar no diagnóstico encontra-se o exame direto do lavado broncoalveolar, que proporciona resultados precoces e úteis para a tomada de decisão, mas não suficientemente testados em diferentes situações clínicas ou experimentais.

Com o objetivo de avaliar o rendimento diagnóstico do exame direto precoce e das culturas quantitativas obtido por lavado broncoalveolar, estudou-se sua utilização em um modelo experimental de pneumonia provocada através de inoculação bacteriana

intrabrônquica em ratos. O estudo comparou a acurácia do exame direto e dos exames culturais em três grupos de animais: Grupo A com pneumonia pneumocócica (37 animais); Grupo P com pneumonia por *P. aeruginosa* (26 animais) e Grupo B controle (10 animais), utilizando a histopatologia dos pulmões como teste de referência para o diagnóstico. Os Grupos A e P foram ainda randomizados em dois subgrupos cada, para tratamento ou não com antibióticos, usando penicilina no grupo pneumococo e amicacina no grupo *Pseudomonas*.

Como resultado, observou-se que nos animais com pneumonia e ausência de antibióticos a pesquisa de bactéria fagocitada (BIC) no exame direto mostrou um rendimento elevado para o diagnóstico, sendo superior ao das culturas quantitativas. No grupo com pneumonia pneumocócica a BIC mostrou: S:94,4% a 100%, E:100%, VPP:100% e VPN:100%; e as culturas quantitativas mostraram: S:77,8%, E:100%, VPP:100%, VPN:40%. Nos com pneumonia por *Pseudomonas* a BIC obteve: S: 69%, E:100%; VPP:100% e VPN:71,4%); e as culturas quantitativas mostraram valores muito baixos: S:28,6%, E:100%, VPP:100% e VPN:50%). Nos animais com pneumonia pneumocócica sob tratamento antibiótico havia uma queda acentuada de sensibilidade das culturas quantitativas (S:21%) e, em menor grau da BIC (S:57,9%), mas sem perda da especificidade de ambos os exames. Ao contrário, nos animais com pneumonias por *Pseudomonas* sob tratamento não havia alteração no rendimento dos dois exames, cujos resultados foram semelhantes aos dos animais sem tratamento. Não havia diferenças de leitura da BIC para o diagnóstico, contando a sua positividade em macrófagos ou em neutrófilos infectados. A avaliação global dos casos estudados, reunindo todos os grupos (tratados e não-tratados) em ambos os modelos de pneumonia, mostrou que a acurácia do exame direto, representado pela pesquisa da BIC, foi superior (66%) ao das culturas quantitativas (53%).

As conclusões principais do estudo foram: 1) o exame direto do lavado broncoalveolar (LBA) mostrou-se um teste útil e de alto rendimento para o diagnóstico de pneumonia quando realizado na ausência de antibióticos; 2) o LBA feito na vigência de antibióticos efetivos para a pneumonia perde mais de 50% de sua acurácia, mas não é afetado quando o antibiótico for ineficaz ou houver resistência ao mesmo; 3) a pesquisa de BIC no LBA é um exame de resultado precoce, de alta especificidade e com melhor rendimento do que as culturas quantitativas.

## SUMMARY

Nosocomial pneumonia is the main cause of nosocomial infection in Intensive Care Units and it presents a high degree of morbi/mortality. The cumulative incidence varies, according to the authors, between the wide limits from 8% to 51%, depending on the type of patient and on the use of instrumentation of the respiratory tract. In the specific cases of non-resolving pneumonias and of the mechanical ventilation associated-pneumonias. The diagnosis is problematic due to the absence of definite standardization, resulting not only from the great physiopathological variability, but also from the little accuracy of the clinical, microbiological and radiological criteria. These facts led to the progressive use of sophisticated invasive techniques to collect respiratory samples. However, the validation of these techniques for a systematic use still depends on studies which evaluate not only their cost/benefit in the diverse clinical settings, as well as on the comparison of its performance for the diagnosis with a histo-pathological gold-standard. Moreover, the results of the invasive techniques are often limited when they are applied to patients under antibiotic therapy. The requirements of the utmost which these tests may provide, discussing their indications and evaluating their technical capacity to confirm or exclude pneumonia is justified by the necessity of a precocious and correct administration of the treatment, because this will result in a lower rate of mortality, reduction of costs, and a shorter stay in hospital. Among the controversial tests which may help in the diagnosis is the direct exam of the bronchoalveolar lavage, which provides precocious and useful results to make a decision but not sufficiently tested in different clinical or experimental situations.

Having the aim of evaluating the diagnostic value of the direct precocious exam and of the quantitative cultures obtained through bronchoalveolar lavage, we studied their use in an experimental model of pneumonia provoked through intrabronchial bacterial inoculation in rats. The study compared the accuracy of the direct examination

and of the quantitative cultures in three groups of animals: Group A with pneumococcal pneumonia (37 animals), Group P with *P. aeruginosa* pneumonia (26 animals), and Group B, controls without pneumonia (10 animals), using the histopathology of the lungs as the reference test for the diagnosis. Groups A and P above were each one of them randomized into two subgroups, for treatment or not with antibiotics, using penicilin in the pneumococcal group and amikacin in the *Pseudomonas* group.

As results it was observed that in the animals with pneumonia and absence of antibiotics the research for intracelular bacteria (ICO) in the direct exam revealed high sensitive diagnosis, superior to that of the quantitative cultures. In the group with pneumococcal pneumonia the ICO revealed (S: 94.4% to 100%; E: 100%; PPV: 100%; PNV: 100% ), and the quantitative cultures (S: 77.8%; E: 100%; PPV: 100%; PNV: 40%). In those with *Pseudomonas* pneumonia, ICO with (S: 69%; E: 100%; PPV: 100%; NPV: 71.4%) and the cultures with (S: 28.6%; E: 100%; VPP: 100%; VPN: 50%). In the animals with pneumococcal pneumonia under penicilin there was a significant fall of the sensibility of yhe quantitative cultures (S: 21%) and also of the ICO, although in a lower degree (S: 57.9%), but without loss of the specificity of both exams. On the contrary, in the animals with *Pseudomonas* pneumonia under amikacin treatment there was no change in the sensibility of the two exams, whose results were similar to those of the animals without treatment. These were no difference in the reading of the ICO in relation to the diagnosis counting its positiveness according to infected macrophages or neutrophiles. The global evaluation of the cases studied, putting together all the groups (treated and not treated) in both models of pneumonia showed that the accuracy of the direct exam represented by the ICO research was superior (66%) to that of the quantitative cultures (53%).

The main conclusions of the study were: 1) the direct exam of the bronchoalveolar lavage revealed it self a useful test of great effectiveness for the diagnosis of pneumonia when performed without antibiotics; 2) the bronchoalveolar lavage performed with the use of antibiotics effective for the pneumonia loses more than 50% of its accuracy, but does not suffer any change when the antibiotic is ineffecient or there is resistance to it; 3) the research of ICO in the bronchoalveolar lavage is an examination of precociuos result, of high specificity with better accuracy than the quantitative cultures.

# **1 INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Pneumonia Nosocomial e Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

### 1.1.1 Epidemiologia, Importância Clínica e Etiologia

As infecções respiratórias são as mais prevalentes nas unidades de tratamento intensivo (UTIs), correspondendo a 50% das infecções nosocomiais em pacientes criticamente enfermos<sup>1,2,3</sup>. A incidência estimada varia entre 2% a 51%, mas a maioria dos estudos refere taxas de 8% a 20%, dependendo da população estudada<sup>4,5</sup>. As oscilações nas taxas de incidência podem ser explicadas tanto pelo tipo de UTI analisada quanto pelas características dos pacientes internados, sendo os fatores mais influentes para a aquisição de infecção a severidade da doença básica subjacente, a causa da insuficiência respiratória, a existência de imunodeficiência e o uso de instrumentação respiratória e ventilação mecânica (VM). Na presença da síndrome da distrição respiratória aguda (SDRA), a incidência de pneumonias chegava a 70% quando diagnosticadas na autópsia de pacientes que morriam em UTI<sup>6,7</sup>. Nos pacientes em uso contínuo de VM, a maioria dos estudos relata taxas médias de 20% ou de 16 a 21 infecções em cada 100 pacientes<sup>1,2,3,4,5</sup>. O *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS) do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDCP)<sup>9</sup>, que acompanha sistematicamente a incidência de infecções nosocomiais nos Estados Unidos, utiliza taxas de incidência por densidade específicas para pneumonia, cujo denominador são 1.000 pacientes/respirador/dias, proporcionando uma comparação mais uniforme entre os os vários tipos de UTIs (Quadro 1).

QUADRO 1 – Taxas médias e por percentil 75 das pneumonias associadas à ventilação mecânica conforme o tipo de UTI – jan. 1995 a abr. 2000 – NNISS

<b>Tipo de UTI</b>	<b>Número de Unidades</b>	<b>Taxa Média de Pneumonia</b>	<b>Taxa por Percentil 75</b>
1. Cardiorácica	60	10,4	13,5
2. Médica	124	7,5	9,0
3. Médico-cirúrgica Univ.	103	11,1	12,6
Não Univ.	161	9,1	11,6
4. Neurocirúrgica	45	15,2	17,3
5. Pediátrica	70	5,2	7,2
6. Cirúrgica	144	13,6	15,4
7. De Trauma	24	15,5	20,9
8. Respiratória	6	4,1	

Taxa de pneumonia = número de pneumonia/ventilador dias x 1000; Univ.=universitária.

A utilização da VM aumenta o risco de infecção em 21 vezes, conforme demonstrado no estudo SENIC realizado pelo CDCP em 1981, com mais de uma década de duração e rastreando 170.000 pacientes hospitalizados, dos quais 1% tratado com VM<sup>10</sup>. Um estudo de Joshi e col.<sup>11</sup> mostrou que o risco de pneumonia aumenta com o tempo de VM, com um pico inicial a partir do sétimo dia consecutivo de sua utilização (OR 2,2 a 2,5) e cresce constantemente a partir de então, ao ponto de ter-se um risco acumulado de 6,5% em 10 dias, de 19% em 20 dias e de 28% em 30 dias. Conforme Craven<sup>13</sup>, as taxas brutas crescem de 1% a 3% por dia de intubação e VM. No entanto um estudo multicêntrico coordenado por Cook<sup>1</sup> mostrou que as taxas de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) decresciam de 3%/dia na primeira semana de VM para 2%/dia na segunda semana e para 1%/dia a partir da terceira semana. O risco decrescente refletia o risco maior existente para a chamada PAVM precoce em pacientes ventilados. O autor sugere que os pacientes que sobrevivem por longo prazo possuem menor risco para a PAVM e também que a pneumonia precoce contribui para mais de 50% dos casos de PAVM, principalmente as causadas por aspiração da faringe em pacientes com nível de

consciência e reflexos deprimidos por doença neuromuscular ou pelo uso de sedativos e drogas paralizantes musculares.

Na América Latina e no Brasil, os poucos estudos disponíveis mostram incidência muito variável de pneumonia nosocomial e PAVM, variando de 13% a 80% ou de 2,6 a 6,2 casos por 100 dias de ventilação (relatos do Consenso Latino Americano de Pneumonia do Paciente Adulto Hospitalizado – San Juan, Porto Rico, janeiro 1998).

Em nosso meio, segundo dados obtidos prospectivamente<sup>14</sup> em uma coorte de 3.458 pacientes internados consecutivamente no período de 5 anos (1995 a 1999) no serviço da UTI médico-cirúrgica de pacientes adultos do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, a incidência de pneumonia nosocomial atingiu 16,8%, baseada na utilização dos critérios diagnósticos clínicos, e, também nas técnicas broncoscópicas (em menos de 10% dos pacientes). Nesse período, foram detectados 306 episódios de pneumonia, com uma taxa de ataque de 8,8%, representando 52,1% de todas as infecções nosocomiais adquiridas no mesmo período, e o diagnóstico de pneumonia estava presente em 63% dos pacientes que faleceram com infecção na UTI. Dessas 306 pneumonias, 190 (62,1%), portanto a maioria, foram associadas à VM. Analisando exclusivamente os 1.116 pacientes que no período foram submetidos à VM, observa-se que 16,8% desenvolveram pneumonia, correspondendo a 32,5 pneumonias por cada 1.000 pacientes/ventilador/dia. A mortalidade foi de 31%, taxa semelhante à descrita por outros autores (Quadro 2).

Outro estudo semelhante em nosso meio, feito por Spiandorello<sup>15</sup> avaliou 160 pacientes em ventilação mecânica e mostrou uma incidência de 18,8% para a PAVM e uma taxa de mortalidade associada de 36,7%.

QUADRO 2 – Incidência e mortalidade das pneumonias adquiridas em ventilação mecânica

<b>Autor</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Craven <sup>13</sup>	233	21,0	Clínico	55,0
Langer <sup>16</sup>	724	23,0	Clínico	44,0
Fagon <sup>12</sup>	567	9,0	Broncoscopia	71,0
Kerver <sup>18</sup>	39	67,0	Clínico	30,0
Jimenez <sup>17</sup>	77	27,0	Broncoscopia	38,0
Driks <sup>19</sup>	130	18,0	Clínico	56,0
Torres <sup>12</sup>	322	24,0	Clínico, bronc.	33,0
Koleff <sup>20</sup>	277	15,5	Clínico	37,0
Silva <sup>14*</sup>	1.116	16,8	Clínico	31,0
Cook <sup>1</sup>	1.014	17,5	Clínico, bronc.	24,0
Spiandorello <sup>15</sup>	160	18,8	Clínico	36,7

\* = dados do autor

Vários fatores predisponentes concorrem para o desenvolvimento da pneumonia em pacientes hospitalizados e a gênese do processo é multifatorial, onde interação não só os fatores decorrentes das condições intrínsecas dos pacientes, mas também os relacionados ao ambiente hospitalar e ao processo de atendimento. Entre os fatores intrínsecos mais importantes do hospedeiro estão: idade avançada, gravidade do estado clínico, obesidade, alcoolismo, tabagismo, estado de consciência (coma e sedação), imunossupressão, doença pulmonar pré-existente (doença broncopulmonar obstrutiva crônica – DBPOC, insuficiência respiratória), aspiração para a trato respiratório inferior dos conteúdos gástricos e das secreções oriundas das vias aéreas superiores<sup>3,10,12,13,19,20,21</sup>. Da mesma forma, a aquisição de infecções respiratórias pode ser facilitada pelo contato clínico-hospitalar, do qual fazem parte: procedimentos cirúrgicos/anestésicos, medicamentos (antiácidos gástricos), uso de sondas gástricas, procedimentos invasivos na via aérea pela inserção de cânulas traqueais e, principalmente, o uso prolongado da VM. Essas ações médicas terminam por bloquear e reduzir a eficiência das defesas naturais das

vias aéreas, facilitando, assim, a contaminação interna dos epitélios por microorganismos provenientes de várias fontes, como manipulação do pessoal hospitalar, aerossóis contaminados, instrumental, ou também pela infecção cruzada a partir de outros pacientes adjacentes, dentro da cadeia epidemiológica da infecção nosocomial bem conhecida na literatura. Considerando todos esses possíveis mecanismos fisiopatogênicos para a aquisição da pneumonia, a via natural mais importante é aquela que inicia pela colonização progressiva das vias aéreas superiores e a subsequente aspiração contínua desses patógenos, mesmo em pacientes intubados, para as vias aéreas inferiores onde iniciam a infecção<sup>1,3,18,20</sup>.

O interesse continuado e o grande número de publicações dedicadas ao estudo da PAVM são suscitados tanto pela sua complexa fisiopatogenia e alta morbi/mortalidade associada quanto pela permanente dificuldade de se estabelecer o padrão diagnóstico definitivo. Uma vez instalada a pneumonia, entre as conseqüências mais importantes alinham-se: maior tempo de permanência dos pacientes tanto em ventilação artificial quanto em UTIs, variando, em média, de 9 a 20 dias suplementares conforme Craven e Fagon<sup>12,13</sup>; maiores custos adicionais conseqüentes (sobrecusto individual de US\$ 2.800); uma relação causa/fatalidade estimada em torno de 50%, com variação de 30% a 76%, sendo uma das causas principais de morte por infecção em UTI<sup>9,10,11,12</sup>. Nessa relação, a mortalidade também pode depender do tipo de agente etiológico implicado e da condição clínica adjacente à infecção respiratória. Dessa forma, como exemplo, as infecções causadas por *P. aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* ou *S. aureus* resistente (MRSA) podem gerar taxas de mortalidade tão elevadas quanto 43%, comparadas a 27% por outras etiologias<sup>12,13,20,21,22</sup>.

No Quadro 3 estão relacionados os agentes etiológicos das infecções respiratórias identificados na UTI do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre. Esses dados estão em conformidade com os divulgados na literatura<sup>1,3,6,12,13,17,20</sup>. Os bacilos Gram-negativos corresponderam a 50% dos casos, e os cocos Gram-positivos, à outra metade. A PAVM de início recente (nos primeiros 4 dias de VM) é freqüentemente causada por *S. pneumoniae*, *Haemophylus influenzae* ou *Moraxella catarrhalis*, enquanto a de início tardio (mais de 5 dias de VM) é comumente provocada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.* e MRSA. Anaeróbios são pouco freqüentes e acometem mais os pacientes cuja pneumonia decorre da aspiração de secreções oro-faríngeas. *Pseudomonas aeruginosa* e MRSA, isoladamente, foram os

agentes etiológicos em 34,2% das pneumonias nosocomiais e em 43,3% das associadas à VM e costumam ter maior mortalidade. A *Candida sp.*, embora apareça com 12% dos agentes isolados, nem sempre é a responsável pela infecção, sendo primordialmente um agente colonizante oportunista em pacientes com antibioticoterapia intensa, mas passa a ter importância nos imunodeprimidos e neutropênicos. No Quadro 3, vê-se que a identificação do agente etiológico foi feita em 98% dos casos das pneumonias associadas à VM e em somente 53% das adquiridas sem uso da ventilação. A maior preocupação na identificação da etiologia no paciente em VM deriva justamente dos riscos decorrentes da sua alta morbi/mortalidade e da necessidade de tratamento imediato tão logo seja identificada. Vários autores<sup>2,4,5,12,17,22</sup>, entretanto, demonstraram, em estudos experimentais e clínicos, que a etiologia costuma ser polimicrobiana em 40% dos casos, principalmente quando a identificação etiológica utiliza métodos de coleta seletiva broncoscópica, que permite colher amostras bacteriológicas mais dirigidas e profundas, que seriam mais difíceis de obter pelo aspirado traqueal simples. Outros agentes de pneumonias, tais como *Legionella sp.* (menos de 2% em infecções nosocomiais), ou mesmo *Mycobacterias*, *Aspergillus sp.* e *Pneumocystis carinii*, afetam basicamente pacientes imunossuprimidos e raramente constam das estatísticas principais sobre PAVM.

QUADRO 3 – Agentes etiológicos das pneumonias nosocomiais em relação ao uso ou não de ventilação mecânica e taxas de mortalidade (Dados do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre)\*

Patógeno	Sem VM N (%)	Com VM n (%)	Total n (%)	Óbitos n (%)
<i>P. aeruginosa</i>	17 (14,6)	47 (24,6)	64 (20,9)	13 (20,3)
<i>MRSA</i>	6 (5,2)	35 (18,7)	41 (13,3)	10 (24,3)
<i>Enterobacter sp.</i>	6 (5,2)	24 (12,6)	30 (9,8)	4 (13,3)
<i>Candida sp.</i>	9 (7,7)	20 (10,5)	29 (9,5)	7 (24,1)
<i>Acinetobacter sp.</i>	3 (2,6)	18 (9,5)	21 (6,9)	3 (14,3)
<i>Klebsiella sp.</i>	5 (4,3)	12 (6,3)	17 (5,5)	3 (17,6)
<i>Serratia sp.</i>	2 (1,7)	5 (2,6)	7 (2,3)	5 (71,4)
<i>S. aureus</i>	3 (2,6)	5 (2,6)	8 (2,6)	7 (87,5)
<i>S. pneumoniae</i>	5 (4,3)	3 (1,6)	8 (2,6)	0
<i>E. coli</i>	2 (2,4)	4 (2,1)	6 (2,0)	3 (50,0)
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	5 (2,6)	5 (1,6)	1 (20,0)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	0	5 (2,6)	5 (1,6)	1 (20,0)
Outros	4 (3,4)	3 (1,6)	7 (2,3)	1 (14,2)
Sem identificação	54 (46,5)	4 (2,1)	58 (18,9)	1 (1,7)
TOTAL	116 (100,0)	190 (100,0)	306 (100,0)	59 (19,2)

Óbitos = n e % em relação ao total de infecções; VM = ventilação mecânica; MRSA = *Staphylococcus* resistente à metilicina/oxacilina. \*: dados do autor.

### 1.1.2 A Questão da Dificuldade Diagnóstica

Vistos com maior atenção, os dados epidemiológicos existentes, tal como descritos acima, possuem limitações se analisados sob a ótica do diagnóstico de certeza para a pneumonia. A ausência de padronização diagnóstica afeta a determinação apropriada das reais taxas de incidência, pois a maioria dos dados é extraída de estudos com diagnósticos feitos por critérios puramente clínicos, tais como os estabelecidos pelo CDCP (como recurso metodológico de rastreamento epidemiológico), porém incompletos para permitir um diagnóstico mais apropriado, criando um viés de seleção e aferição dos pacientes e causando uma superestimação da incidência<sup>23,24,25,26</sup>. Dessa forma, a questão do aperfeiçoamento diagnóstico é uma necessidade básica buscada em todos os novos estudos e ensaios clínicos/epidemiológicos sobre o tema. A busca de uma melhor padronização da linguagem foi a proposta da Conferência de Consenso de 1992<sup>27</sup> motivada pela diversidade de metodologia dos trabalhos publicados e as freqüentes variações ainda presentes nos resultados e conclusões dos estudos. Essa questão dificulta a realização de revisões sistemáticas e de estudos em grande escala destinados a estabelecer riscos associados, taxas de incidência e apreciação dos desfechos relacionados à PAVM. Como conseqüência, muito pacientes recebem tratamento inadequado, que geram, por sua vez, riscos e custos exagerados, além de dificultar o esclarecimento das causas da febre e dos infiltrados pulmonares.

As seções seguintes discutirão e procurarão fazer uma reflexão tanto sobre as limitações do diagnóstico clínico quanto sobre as técnicas atuais de diagnóstico complementar na PAVM.

O diagnóstico de pneumonia é tradicionalmente estabelecido com base na combinação de elementos de história e exame clínico e de achados radiológicos e microbiológicos, considerados dentro do contexto epidemiológico (dados demográficos, origem, circunstâncias ambientais, fatores de risco, etc.) como ponto de partida para o manejo dos pacientes.

Os critérios clínicos para o diagnóstico de pneumonia repousam no modelo não nosocomial e não submetido à VM cujos elementos clássicos evocadores são: febre, dor torácica ventilatório-dependente, taquipnéia, tosse, escarro purulento, sinais estetoacústicos de consolidação pulmonar, associados à leucocitose ou leucopenia com ou sem

aumento de formas jovens. Esses critérios formais, no entanto, perdem geralmente muito da sua utilidade quando se trata de um paciente criticamente enfermo, sedado, intubado e freqüentemente conectado à VM, restrito fisicamente ao leito de um UTI, possuindo diversas co-morbidades e outras doenças pulmonares concomitantes, o que determina uma série de dificuldades e limitações para a correta interpretação dos sinais clínicos e dos infiltrados pulmonares. Nesta perspectiva, na suspeita de uma pneumonia nosocomial em paciente em VM, o valor preditivo dessas mesmas variáveis é nitidamente inferior, principalmente quando os pacientes estão sendo ventilados por SDRA<sup>7,8,20</sup>. No trabalho de Andrews e colaboradores<sup>6</sup>, comparando os critérios clínicos para o diagnóstico de pneumonia com os achados histológicos nos pulmões de 24 pacientes que morreram com SDRA, pneumonia foi diagnosticada à necropsia em 58% dos casos, um terço das quais sem suspeita clínica prévia (falso-negativo), havendo erro clínico no diagnóstico de pneumonia em 20% dos pacientes que possuíam somente dano alveolar difuso sem infecção à necropsia (falso-positivo). Nessa série, o erro nos diagnósticos clínicos atingiu 29% dos casos. Os critérios estabelecidos pelo CDCP – febre, infiltrado de surgimento recente pulmonar, escarro purulento e leucitose/leucopenia – embora práticos de serem aplicados, são altamente inespecíficos em pacientes intubados em UTI<sup>23,24,25,26,27,28</sup> e achados comuns em múltiplas situações de pacientes criticamente enfermos. Em um estudo de avaliação da sensibilidade e acurácia dos critérios clínicos no diagnóstico da PAVM realizado por Fagon e colaboradores<sup>24</sup>, foram utilizados 84 pacientes clinicamente suspeitos de terem infecção respiratória, dos quais somente 27 possuíam PAVM comprovada por escovado brônquico protegido (PSB). Os elementos clínicos diagnosticaram corretamente apenas 64% dos pacientes com e sem pneumonia, independentemente de terem sido feitos por médicos experientes ou principiantes, demonstrando sua baixa especificidade e acurácia, onde a chance de erro, seja por excesso ou por falta, situa-se em torno de 30% ou mais dos casos.

Pugin e colaboradores<sup>29</sup> procuraram estudar o valor isolado de diversas variáveis clínicas isoladas e combinadas, validando um escore diagnóstico, o *Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)* (Quadro 4), onde são utilizados, ponderalmente, elementos clínicos, radiológicos, relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , número de aspirados traqueais e o resultado dos exames microscópico direto e cultural. A combinação dessas variáveis, aumentando o poder de predição, foi confrontada através de correlações com os resultados das culturas quantitativas obtidas por lavado broncoalveolar (LBA). Nesse escore é

utilizado o “índice bacteriano” descrito por Johanson<sup>22</sup> a partir dos resultados culturais como elemento para ampliar o rendimento diagnóstico, com uma possibilidade de até 12 pontos e, sempre que fosse atingido o escore igual ou superior a 6, a PAVM era corretamente identificada. Em trabalhos posteriores<sup>30,31,32</sup>, a acurácia do CPIS foi comparada à histologia do pulmão em pacientes que faleceram, obtendo-se sensibilidade média de 72% e especificidade de 85%, sendo que havia uma melhora da performance quando os critérios clínicos eram associados ao resultado da cultura do aspirado traqueal (AT). O CPIS permanece como um critério clínico mais útil do que o critério simples do CDCP para ser utilizado à beira do leito na tentativa de identificar precocemente os pacientes com maior probabilidade de PAVM, mas necessita ainda de estudos mais definitivos para otimizar o desempenho clínico.

QUADRO 4 – Escore clínico de infecção pulmonar (CPIS), conforme Pugin e colaboradores<sup>29</sup>

<b>1. Temperatura ( C )</b>	<b>&gt; 36,5 a ≤ 38,4 = 0 pontos</b>
	≥ 38,5 a < 39 = 1
	≥ 39 ou < 36 = 2
<b>2. Leucócitos</b>	<b>&gt; 4000 a ≤ 11000 = 0 pontos</b>
	< 4000 ou > 11000 = 1 (+ 1 se > 10% formas imaturas)
<b>3. Secreções traqueais (número de aspirações realizadas)</b>	<b>&lt; 14 = 0 pontos</b>
	> 14 = 1 (+ 1 se forem purulentas)
<b>4. Oxigenação: PaO<sub>2</sub>/ FiO<sub>2</sub> em mmHg</b>	<b>&gt; 240 ou SDRA = 0 pontos</b>
	< 240 sem SDRA = 2
<b>5. Infiltrado pulmonar radiográfico</b>	<b>Nenhum = 0</b>
	Difuso = 1
	Sistemático = 2
<b>6. Cultura semiquantitativa do aspirado traqueal (BI : 0-1-2 ou 3+)</b>	<b>Ausência ou &lt; 1 = 0 pontos</b>
	Bactéria > 1 = 1 (+1 ponto se Gram concordante)

Da mesma forma, a presença de infiltrado de surgimento recente radiológico, geralmente obtido em radiogramas convencionais ou mesmo por tomografias computadorizadas, em pacientes de UTI submetidos ou não à VM, não permite distinguir a consolidação infecciosa pneumônica das infiltrações decorrentes do edema de permeabilidade pulmonar na SDRA ou daqueles resultantes de aspiração ou de inflamação não infecciosa<sup>33,34,35,36,37</sup>. Radiogramas de tórax feitos no próprio leito com aparelhos

portáteis, portanto limitados tecnicamente, agregam um valor ao diagnóstico não superior a 5% ou 6%. Mesmo as tomografias computadorizadas dos pulmões aumentam o poder diagnóstico em somente 30%<sup>27,28</sup>. Entre as diversas causas de infiltrados pulmonares vistas nos documentos radiológicos, as infecções (pneumonias) podem ser confundidas com deposição de material patológico nos espaços alveolares, nos ductos e nos septos, tais como transudatos, exsudatos, sangue, tecido de granulação e infiltrados neoplásicos<sup>27,28,32,34</sup>. Wunderink<sup>34</sup> comparou a acurácia dos radiogramas de pulmão feitos no leito, nos quais 7 sinais radiológicos eram pesquisados, em 69 pacientes com suspeita de PAVM. Vinte e quatro deles tiveram o diagnóstico de pneumonia confirmado por autópsia e havia concordância com os sinais radiológicos em somente 65% dos casos, proporcionando uma razão de probabilidade positiva (LR+) de somente 1,97 e negativa (LR-) de 0,29. Novamente aqui existem críticas aos estudos que comparam os resultados desses exames com os das autópsias, pois geram alguma dificuldade em transpor ou generalizar as conclusões para os pacientes com PAVM que sobrevivem.

Os critérios de diagnóstico microbiológico dependem da obtenção de amostras bacteriológicas coletadas das vias respiratórias inferiores. A coleta através de aspirados traqueais rotineiros, não-quantitativos, que representam a maioria das situações encontradas na prática diária, oferecem resultados que não distinguem a bactéria colonizante das vias aéreas daquela responsável pela infecção em curso. A adesão bacteriana, principalmente dos bacilos Gram-negativos aos tubos plásticos endotraqueais ubíquos após 48h de instalação desses materiais, ocasiona equívocos na interpretação das amostras de aspirados traqueais e conseqüentes erros de tratamento em muitos casos<sup>38,39,40,41</sup>. As coletas distais e protegidas por via broncoscópica ou não-broncoscópica foram desenvolvidas para tentar contornar a constante possibilidade de contaminação proximal das amostras, mas avaliam somente um território muito restrito do pulmão que pode ou não ser representativo da área de infecção. Embora representem uma melhor alternativa diagnóstica, até hoje, os inúmeros estudos e trabalhos realizados sobre esta questão não conseguiram ainda demonstrar, definitivamente, o custo/efetividade dos testes invasivos sobre os exames não dirigidos<sup>41,42,43</sup>.

Os motivos da dificuldade diagnóstica na PAVM decorrem da sua fisiopatogenia complexa e multifatorial. O estabelecimento da infecção no parênquima pulmonar necessita de um inóculo com concentração microbiana de pelo menos  $10^3$  ufc/g de tecido pulmonar, na ausência de antimicrobianos circulantes ou teciduais.

Concentrações bacterianas menores não têm capacidade de desenvolver pneumonia histologicamente comprovada a não ser em pacientes imunodeprimidos. Esses conceitos derivam basicamente de estudos experimentais em animais<sup>22,45,46</sup>. No trabalho de Johanson<sup>22</sup>, feito em babuínos, existia uma correlação positiva entre a intensidade da pneumonia anatômica e a quantidade de bactérias estabelecidas por cultura tecidual. Posteriormente, os estudos de Rouby<sup>47</sup>, em pacientes que morreram com PAVM, mostraram que a concentração bacteriana no tecido pulmonar se correlacionava positivamente com o estágio evolutivo da infecção pulmonar. Nesse trabalho, demonstrou-se que havia uma variação da concentração microbiana tecidual pulmonar desde quantidades inferiores a  $10^3$  ufc/g de tecido na fase inicial de bronquiolite focal, passando para valores superiores a  $10^3$  ufc/g na fase de pneumonia histologicamente comprovada, até atingir mais de  $10^8$  ufc/g quando a infecção chegava à fase de necrose e abscesso do parênquima (fase 3 de Johanson). O mesmo autor<sup>48</sup>, em análises quantitativas culturais de parênquima pulmonar realizadas *post-mortem* em pacientes que faleceram em VM, não conseguiu demonstrar uma concordância ótima entre histologia e cultura do parênquima no limiar de  $10^3$  ufc/g, visto que a distribuição das áreas infectadas era difusa e irregular, principalmente nas regiões pendentes dos pulmões, com vários estágios patológicos coexistindo em áreas contíguas.

A mesma opinião foi a de Fabregas<sup>32</sup> em estudo de 25 pacientes em VM por mais de 72h que morreram. O autor comparou a histologia desses pulmões através de 375 amostras coletadas de forma dirigida ou não e encontrou resultados similares aos de Rouby, demonstrando a dificuldade de se estabelecerem correlações entre a concentração bacteriana pulmonar e a fase evolutiva da pneumonia. Resultados também desabonadores foram vistos em estudos *post-mortem* por outros autores<sup>49,50,51</sup>, em qualquer limiar de cultura considerado.

A administração de antibióticos, tanto tópicos quanto parenterais, muda os critérios numéricos, e o desenvolvimento de infecção irá depender tanto da virulência do patógeno quanto do estado das defesas naturais do hospedeiro. Considerando que 40% das infecções na PAVM são polimicrobianas, Johanson<sup>22</sup> propõe a utilização do índice bacteriano (BI) composto pela soma dos valores do logaritmo decimal de cada espécie, para expressar a contaminação total bacteriana do pulmão. Assim, um BI de 6 representa tanto a presença de uma única espécie bacteriana com concentração de  $10^6$  ufc/ml no LBA, como também de duas espécies, cada uma com concentração de  $10^3$  ufc/ml. Vários autores

e a Conferência de Consenso de 1992 utilizam esse valor para seus resultados<sup>29,39,51</sup>. No trabalho de Johanson, um BI superior a 6 esteve sempre associado com a presença de pneumonias de grau moderado a severo. Para esse autor, o importante é o fato de conhecer os germes presentes no parênquima pulmonar e não de tentar isolar um único germe como responsável, e um BI acima de 6 é teoricamente mais grave do que um BI igual a 4. A utilização desse índice passou a sofrer críticas por ser um critério ainda não validado em humanos<sup>30,47,56</sup> em função da variabilidade do quadro clínico e histopatológico da PAVM, e nem o BI ou a cultura tecidual foram objeto de trabalhos suficientemente convincentes para se tornarem critérios obrigatórios. Na PAVM, a essa dificuldade se acresce o fato de coexistirem, muitas vezes, em um mesmo lobo ou segmento pulmonar, processos pneumônicos em diferentes fases evolutivas, bronquiolite e pneumonia confluenta; portanto, a obtenção de culturas quantitativas tanto por amostras alveolares quanto por biópsia pode mostrar variações capazes de, em um mesmo paciente, induzir à má interpretação dos resultados<sup>48,51</sup>.

Em face de todas essas dificuldades em estabelecer o diagnóstico correto da PAVM, na Conferência Internacional de Consenso para a Investigação Clínica de Pneumonia Associada ao Respirador, realizada em 1992<sup>27,39</sup>, os participantes sintetizaram os critérios diagnósticos recomendando a adoção de uma terminologia padronizada que inclui: “pneumonia definida”, “pneumonia provável”, “ausência definida de pneumonia” e “provável ausência de pneumonia” (Quadro 5). Mesmo com tais critérios, percebe-se que na prática clínica diária é infreqüente o encontro de hemoculturas positivas, ou prova radiográfica de cavitação pulmonar, ou a realização de biópsia pulmonar, o que torna muito raro o estabelecimento do diagnóstico de pneumonia definida. Assim, na presença de infiltrado pulmonar novo ou progressivo e de secreções traqueobrônquicas purulentas em pacientes intubados e ventilados, os especialistas recomendam que o diagnóstico de pneumonia seja restrito aos casos com culturas quantitativas positivas de secreções obtidas do trato respiratório inferior através de uma técnica que minimize a contaminação com a flora respiratória superior, visto que raramente se utilizará biópsia por agulha ou cirúrgica.

### QUADRO 5 – Critérios diagnósticos de pneumonia associada ao respirador

Pneumonia definida: infiltrado novo ou progressivo ou persistente, secreção traqueal purulenta e um dos seguintes:

- 1) evidência radiológica de abscesso pulmonar com cultura positiva obtida na aspiração por agulha do abscesso;
- 2) prova histológica ou biópsia cirúrgica ou por autópsia de abscesso ou consolidação pneumônica com acumulação de polimorfonucleares, ou cultura positiva do tecido pulmonar de >10<sup>4</sup> microorganismos/g de tecido.

Pneumonia provável: infiltrado novo, progressivo ou persistente; secreção traqueal purulenta e um dos seguintes:

- 1) cultura quantitativa das secreções do trato respiratório inferior obtidas por técnica que minimize a contaminação pela flora do trato respiratório superior (lavado broncoalveolar ou escovado protegido);
- 2) hemocultura positiva, não relacionada a outra fonte, isolado no período de 48h prévio ou posterior, ao isolamento de mesmo microorganismo encontrado nas secreções do trato respiratório inferior;
- 3) cultura positiva do líquido pleural de um microorganismo idêntico ao encontrado nas secreções do trato respiratório inferior;
- 4) prova histológica na biópsia pulmonar ou na autópsia de pneumonia mais cultura do tecido pulmonar <10<sup>4</sup> ufc/g.

Ausência definida de pneumonia: em pacientes em que não há critérios de pneumonia definida, a ausência é definida quando se encontra um dos seguintes:

- 1) exame por autópsia dentro de 3 dias da suspeita clínica de pneumonia não mostrando nenhum sinal histológico de infecção pulmonar;
- 2) etiologia alternativa definida com ausência de crescimento em amostra do trato respiratório adequadamente obtida;
- 3) identificação citológica de um outro processo que não pneumonia sem crescimento bacteriano significativo em amostra respiratória adequadamente obtida.

Provável ausência de pneumonia: é indicada pelo não-crescimento bacteriano significativo em amostra respiratória adequadamente obtida ou um dos seguintes:

- 1) resolução sem terapia antibiótica de um dos seguintes: febre, infiltrado radiográfico, ou infiltrado radiográfico e diagnóstico definitivo alternativo;
- 2) febre persistente e infiltrado radiográfico com um diagnóstico alternativo definitivamente estabelecido.

### 1.1.3 Conseqüências da Dificuldade Diagnóstica

Na prática médica diária em UTIs, na presença de infiltrados pulmonares e febre, com suspeita de pneumonia, é iniciado o tratamento antibiótico empírico precoce na imensa maioria dos pacientes, decorrente tanto do receio que os médicos possuem da alta morbi/mortalidade desses casos, como também da dificuldade e demora para o estabelecimento de um diagnóstico confiável. A demora em se iniciar o tratamento antibiótico em pneumonias tanto comunitárias quanto nosocomiais é um fator de maior mortalidade<sup>20,43,44</sup>. Por outro lado, a atitude de tratamento empírico com pouco embasamento diagnóstico comporta também outros riscos. Primeiramente, a ausência do diagnóstico etiológico correto não permite a escolha do antibiótico apropriado, o que leva geralmente tanto ao tratamento exagerado, com duas ou mais drogas de amplo espectro, como também inapropriado, visto o número de situações clínicas não infecciosas que simulam pneumonia e confundem o médico. Em segundo lugar, quando desnecessário, o supertratamento adiciona custos (20% da conta hospitalar são representados por antibióticos dispendiosos), aumenta a incidência de efeitos colaterais deletérios (toxicidade das drogas) e, mais importante, favorece o desenvolvimento de colonização e superinfecção por microorganismos multi-resistentes. A multi-resistência representa hoje um dos grandes problemas e temores das UTIs e está associada com maior mortalidade e poder de disseminação para outros pacientes<sup>20</sup>.

Nesse cenário e com essas perspectivas que confundem o raciocínio médico reside a importância da busca e do desenvolvimento de métodos que permitam maior qualificação diagnóstica ao tratar-se de pneumonia nosocomial. Visto de uma forma ideal, o exame diagnóstico deve possibilitar o recolhimento de todos os agentes etiológicos responsáveis (sensibilidade), sem a presença de contaminantes (especificidade), ser prático e reprodutível em cada situação, não ser prejudicial e ter sua validade estabelecida através de um exame de referência. Na prática, a diversidade das situações clínicas e a ausência de um exame ideal levam a procurar novas técnicas diagnósticas com maior aplicabilidade para a maioria dos casos e que facilitem o processo de decisão (confirmação ou exclusão do diagnóstico), ao mesmo tempo que minimizem o risco do mau tratamento.

### 1.1.4 Evolução dos Critérios Diagnósticos Microbiológicos

Nos últimos 12 anos, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e testadas com o objetivo de refinar o diagnóstico motivadas pelas incertezas advindas da falta de acurácia do diagnóstico clínico. A proposição de utilizar culturas quantitativas, através de coletas seletivas das vias aéreas, iniciou com o trabalho original de Wimberley<sup>52</sup> e foi aperfeiçoada por vários autores desde então<sup>56,57,58,59,60,61,63</sup>. Essa abordagem causou grande impacto nas formas de manejo dos pacientes e originou fóruns de contínua discussão até os dias de hoje face à variação metodológica entre os autores e à dificuldade de se obterem estudos longitudinais e evidências objetivas científicas fortes. Por outro lado, o aperfeiçoamento dos sistemas de coleta, tanto através de técnicas broncoscópicas quanto não broncoscópicas, acrescentou outras variáveis diagnósticas e trouxe mais complexidade à discussão.

Na opinião de Bartlett<sup>55</sup>, a necessidade de utilizar técnicas invasivas para o diagnóstico de infecção pulmonar deriva de algumas premissas, tais como: 1) uso reservado para pacientes em que as técnicas não invasivas e mais simples são insuficientes para se obterem resultados conclusivos; 2) existência de suporte laboratorial adequado com experiência e competência técnica que assegure o processamento correto. O resultado de tais técnicas é influenciado pela qualidade dos estudos microbiológicos em termos de coloração e culturas, onde o fator crítico que mais induz ao erro é a origem da amostra estudada. Recomenda-se, na decisão de realizar um teste invasivo, ter sempre em mente quais os agentes etiológicos em questão e quais os estudos necessários naquela amostra e naquele paciente, além da necessidade de o material ser levado imediatamente ao laboratório para processamento.

Após quase 12 anos de estudos e publicações, as principais questões de debate são basicamente aquelas que dizem respeito:

- à oportunidade de realização do exame, principalmente por técnica invasiva;
- à acurácia de cada teste;
- à possibilidade de obtenção de um teste padrão-ouro comparativo;

- aos limiares de interpretação positiva ou negativa dos resultados microbiológicos com importância clínica;
- às análises de custo/benefício e risco/benefício;
- à disponibilidade e facilidade do emprego;
- à repercussão desses métodos em relação aos desfechos clínicos principais no paciente com pneumonia (cura, morbi-mortalidade e estudos de custo efetividade).

As críticas mais severas sobre a utilização das técnicas invasivas repousam sobre a escassez de evidências clínicas quanto ao real impacto do seu emprego em termos de custo/benefício ou de custo/efetividade quando comparadas com o manejo dos pacientes sem uso das mesmas<sup>41,42,64,65</sup>. Em estudo randomizado com 51 pacientes em VM, Sanchez Nieto e colaboradores<sup>64</sup> avaliaram o impacto do uso do PSB e LBA via endoscópica *versus* o manejo não endoscópico sobre a morbidade e a mortalidade por PAVM. Nesse trabalho não havia diferenças significativas quanto a mortalidade, permanência em UTI e duração da VM entre os dois grupos. Apesar de haver mais modificações na antibioticoterapia no grupo com uso de técnicas invasivas, esse efeito não se traduzia em menor mortalidade. Outro grupo espanhol<sup>65</sup>, em um estudo prospectivo com 91 pacientes com suspeita de PAVM, comparou a abordagem invasiva tanto broncoscópica quanto não-broncoscópica (45 pacientes) com a abordagem puramente clínica (43 pacientes), não havendo diferenças em desfechos como dias em UTI, em VM e mortalidade. Esse estudo, entretanto, não foi randomizado nem possuía critérios rígidos de comparação quanto à severidade dos pacientes. Os autores reconhecem, contudo, a necessidade de uma investigação mais ampla sobre a questão visto o pequeno número de pacientes avaliados. Já Fagon<sup>66</sup>, mais recentemente, realizou um ensaio randomizado multicêntrico onde ampliou o espectro de abrangência das técnicas diagnósticas incluindo 413 pacientes com suspeita de PAVM, em que comparou a estratégia invasiva (PSB e LBA) *versus* a não invasiva, com base no diagnóstico clínico e na coleta do AT, avaliando desfechos importantes, tais como: mortalidade em 14 e 28 dias, falência orgânica por sepse e uso de antimicrobianos na UTI. Ficou constatada uma leve superioridade na melhora dos desfechos no grupo que adotava a tática invasiva de diagnóstico, com redução da mortalidade em nove pontos percentuais aos 14 dias de UTI (redução relativa de risco de 7% e absoluta de 9,6 %), menor número de disfunções orgânicas e menor tempo de uso de antibióticos.

A opinião favorável sobre as vantagens do tratamento correto *versus* o tratamento empírico na PAVM encontra defensores importantes. Koleff<sup>67</sup> mostra que a seleção dos antibióticos para o tratamento inicial é um determinante importante da evolução e da mortalidade hospitalar, sendo esta significativamente menor nos pacientes tratados adequadamente com drogas orientadas pelas coletas seletivas através de exames invasivos, quando comparados aos tratados empiricamente. Tal posição encontra defensores como Alvarez-Lerma<sup>71</sup>, Rello<sup>69</sup>, Luna<sup>68</sup>, Trouillet<sup>70</sup>, San Pedro<sup>40</sup>, envolvendo, entre esses 5 autores, 805 pacientes acompanhados, que mostraram os benefícios da escolha racional do tratamento baseada na identificação correta dos patógenos.

Outra questão muito discutida é a perda em torno de 50% da acurácia das culturas quantitativas quando realizadas em pacientes sob efeito de antimicrobianos, o que representa mais da metade dos casos na prática médica diária<sup>49,50,51,54,58,59</sup>. Tendo em vista esta realidade, ressalta-se que, antes de concluir sobre a existência ou ausência de pneumonia, é necessário levar em conta que toda interpretação de resultados para qualquer das técnicas comporta uma margem de erro que deve ser avaliada sempre dentro da probabilidade maior ou menor de infecção, dependendo da situação clínica existente. Baker e colaboradores<sup>72</sup>, considerando as limitações acima, propõem um modelo probabilístico, baseado em análise de decisão, para ser aplicado em cada caso, e que, na visão do conhecimento atual, melhor se ajustaria na interpretação dos resultados dos exames. Levando em conta o balanço da avaliação clínica (probabilidade pré-teste) e o resultado do exame cultural por qualquer técnica quantitativa, julgam-se sempre as vantagens da probabilidade pós-teste de existência da doença (pneumonia) e o benefício do tratamento *versus* a probabilidade de não existir pneumonia e o paciente ser prejudicado pelo tratamento desnecessário (multi-resistência). Assim, quanto maior a probabilidade pré-teste de pneumonia, maior a possibilidade de benefício de se utilizarem antibióticos, mesmo com resultados culturais em limiares inferiores aos recomendados (Quadro 6). Da mesma forma, havendo baixa probabilidade pré-teste, devem-se exigir resultados culturais com limiares diagnósticos mais elevados e não limitar o diagnóstico a um valor rígido preestabelecido.

QUADRO 6 – Limiares diagnósticos apropriados para o tratamento da PAVM com base nas culturas quantitativas em ufc/ml do lavado broncoalveolar\*

Probabilidade clínica Pré-teste de Pneumonia	Risco/Benefício estimado do tratamento		
	Alto (2,0)	Intermediário (0,4)	Baixo (0,1)
Alta (64%)	$\geq 10^2$	qualquer	qualquer
Intermediária (50%)	$\geq 10^3$	$\geq 10$	qualquer
Baixa (18%)	$\geq 10^6$	$\geq 10^3$	$\geq 10$

\* conforme Baker<sup>72</sup>

## 1.2 Avaliação Crítica sobre as Diversas Técnicas Diagnósticas na Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

### 1.2.1 Aspirado Traqueal

É uma técnica de coleta simples, prática, de fácil execução e cuja importância atualmente voltou a ser considerada, face a tais vantagens e à redução de custos e disponibilidade imediata em qualquer momento à beira do leito. O custo por exame das técnicas broncoscópicas não é inferior a US\$ 400, aqui não incluídas as despesas com os equipamentos e sua desvalorização e possíveis complicações dos procedimentos broncoscópicos, enquanto a coleta por AT situa-se em torno a US\$ 40.

As secreções obtidas proximalmente na traquéia têm alta probabilidade de conter os patógenos do território infectado, por se situarem na via de drenagem comum da árvore traqueobrônquica. Por outro lado, as coletas por AT, sendo proximais, são limitadas às porções altas da traquéia e sujeitas à contaminação grosseira de bactérias aderentes aos tubos plásticos traqueais, que costumam aparecer nos 2 a 3 primeiros dias de utilização<sup>38,73</sup>. As pneumonias nosocomiais e a PAVM têm geralmente uma distribuição centrífuga, cujos patógenos são provenientes da flora bacteriana da orofaringe. Na situação inversa, a drenagem de secreções com germes procedentes da periferia dos pulmões pela traquéia irá conter, na maioria dos casos, os patógenos causadores da pneumonia. Assim, a sensibilidade do método não foi jamais contestada; entretanto, comparado aos demais

métodos, sua especificidade é muito fraca quando avaliada por seu resultado qualitativo (como acontece com a maioria dos casos em nosso meio). A partir de comparações desses resultados com culturas quantitativas obtidas por PSB ou LBA, mais recentemente foi proposto um critério quantitativo semelhante para o AT. Procurando uma relação entre a concentração bacteriana medida pelo AT e a probabilidade de PAVM, dois trabalhos, um de Borderon e colaboradores<sup>74</sup> e outro de Salata e colaboradores<sup>38</sup>, estudaram os critérios diagnósticos de diferenciação entre colonização e infecção baseados na análise dos aspirados traqueais em pacientes intubados. O segundo grupo de autores mostrou que a graduação quantitativa do Gram e da presença de bactéria intracelular nos ATs se correlacionava positivamente com a intensidade das culturas quantitativas nos casos de infecção, quando comparados aos de colonização, utilizando para o reconhecimento da infecção critérios probabilísticos (culturas do sangue e escarro, cavitação, biópsia pulmonar e critérios clínicos). Marquette e colaboradores<sup>75</sup>, em 1993, compararam, em 52 pacientes em VM, os resultados do AT com BSP e observaram que, no limiar de  $10^6$  ufc/ml do AT, havia uma concordância de 86% entre os resultados das duas modalidades, com sensibilidade de 82% e especificidade de 83% para a AT. O mesmo grupo<sup>76</sup>, em 1995, comparou o AT com LBA e PSB em outros 28 pacientes com suspeita de PAVM que faleceram e que tinham 67% de pneumonia confirmada em exame *post-mortem*. Os resultados do AT eram superponíveis aos da PSB: sensibilidade de 55,5%, especificidade de 85,5%, valor preditivo positivo de 89% e valor preditivo negativo de 49%. El-Ebiary<sup>77</sup> também encontrou resultados semelhantes usando como referência a histologia e a positividade das hemoculturas e culturas do líquido pleural, mas adotou o limiar diagnóstico de  $10^5$  ufc/ml, com sensibilidade e especificidade em torno de 70%. Resultados um pouco diversos foram verificados nos trabalhos de Kirtland, em 1997<sup>50</sup>, em que, comparando as diversas técnicas diagnósticas com estudos *post-mortem*, questionou a validade das técnicas de coleta intrabrônquica, mesmo obtendo sensibilidade de 87% e especificidade de 31% para o AT no reconhecimento do agente etiológico da PAVM quando comparadas aos resultados das culturas de pulmão.

Dessa forma, de acordo com os conhecimentos atuais, desde que se apliquem critérios quantitativos, o AT tem um rendimento em valor diagnóstico semelhante ao do PSB, com a vantagem de sua simplicidade, reprodutibilidade do teste e baixo custo, sendo por isto indicado para os casos com suspeita de pneumonia nosocomial. Para tanto, é fundamental a experiência do serviço de bacteriologia do local na avaliação inicial da

qualidade das amostras, considerando-se para cultura somente aquelas com ausência de células escamosas, leucócitos superiores a 25 por campo e presença de macrófagos alveolares.

Uma revisão sistemática sobre a avaliação do AT no diagnóstico da PAVM através de estudos selecionados por nível de evidência científica feita por Cook<sup>78</sup>, arrolou 600 pacientes e permitiu concluir que:

- a sensibilidade e a especificidade das culturas quantitativas do AT variam amplamente na sua habilidade diagnóstica;
- culturas qualitativas geralmente identificam os agentes etiológicos encontrados nos testes invasivos (alta sensibilidade), porém recuperam múltiplos organismos, incluindo os não patogênicos (valor preditivo positivo moderado). Com resultado negativo, o diagnóstico de pneumonia é improvável, a menos que o paciente esteja recebendo antibióticos (especificidade moderada);
- com episódios iniciais e subsequentes de PAVM, os resultados dos testes diagnósticos variam com a carga bacteriana, a duração da VM e o uso de antibióticos;
- o exame do Gram e as culturas do AT podem ser úteis no diagnóstico da PAVM (evidência de grau D) e os estudos existentes geram dados insuficientes para trazer recomendações práticas (os trabalhos selecionados na literatura para buscar evidência não têm mais que 600 pacientes). Há necessidade de estudos de melhor qualidade, existindo diferenças entre os atuais quanto ao desenho e grande variação na sensibilidade (de 38% a 100%) e na especificidade (de 14% a 100%). Não é possível usar esses resultados para diagnosticar ou descartar PAVM.

### **1.2.2 Escovado Brônquico Protegido**

A técnica do PSB vem sendo adotada há quase 20 anos para o diagnóstico de pneumonias e foi refinada para o uso em PAVM<sup>52,55,56,59,79,82,90</sup>. Devido ao fato de avaliar

somente uma pequena área específica do pulmão, tem sido criticada, quando comparada às demais técnicas que rastreiam áreas pulmonares maiores, como o LBA. Marquette<sup>75</sup> e Gerbaux<sup>80</sup> revisaram a reprodutibilidade do exame fazendo 5 amostras separadas para a mesma área examinada e encontraram uma variabilidade alta, em torno de 25% (falso-positivo ou falso-negativo). A variabilidade depende também da habilidade do examinador e do local de realização do escovado, que são questões em geral pouco definidas. Por outro lado, o PSB possui maior especificidade do que o LBA e o AT, mas não fornece o exame direto das amostras alveolares, dependendo, portanto, dos resultados das culturas, mais demoradas. Existem somente quatro estudos que comparam seu rendimento com exames histológicos<sup>30,59,56,49</sup>; nos demais, os pacientes são definidos somente por critérios clínicos. A tendência atual é reduzir a utilização do PSB, em comparação com as demais técnicas, devido às limitações já mencionadas, mas não se pode deixar de levar em consideração a experiência de cada serviço no melhor uso da técnica.

As conclusões obtidas sobre o PSB através de estudos classificados segundo os níveis de evidência científica por Baughman<sup>81</sup> emergiram da seleção de 18 trabalhos que permitiram estabelecer as seguintes características do teste:

- a sensibilidade varia de 36% a 95%, com média de 67%, mesmo considerando estudos cujo padrão de referência é a autópsia. O uso variável de antibiótico entre os estudos e o ponto de corte de  $10^3$  ufc/ml como limiar diagnóstico para pneumonia são arbitrários no caso da PAVM;
- a especificidade varia de 50% a 100%, com média de 95%, sendo o exame mais específico do que sensível;
- a razão de probabilidades (*Likelihood Ratio* – LR) mostra um LR positivo de 16, havendo um estudo com valores inferiores a 1<sup>56</sup>;
- não se demonstraram vantagens do PSB sobre o LBA de forma convincente, sendo o primeiro mais específico.

### 1.2.3 Lavado Broncoalveolar Broncoscópico

Os trabalhos iniciais sobre a utilidade do LBA foram feitos em estudos de pneumopatias em pacientes imunodeprimidos<sup>61,63</sup>, onde a técnica mostrou-se útil na obtenção de amostras para exame citológico e cultural e na identificação de patógenos na presença de infiltrados pulmonares. Subseqüentemente, os investigadores passaram a utilizar os testes culturais do LBA no diagnóstico das pneumonias bacterianas em pacientes não imunocomprometidos com pneumonias comunitárias<sup>57,83</sup> ou nosocomiais<sup>58,84</sup>, e a técnica passou a ser amplamente aplicada desde então.

As vantagens do LBA sobre o PSB na PAVM refletem-se na sua maior sensibilidade e na possibilidade de rastrear, em cada coleta, mais de um milhão de alvéolos e uma quantidade de secreção muito maior, com amostras bacterianas 5 a 10 vezes maiores em relação ao PSB<sup>85</sup>. Além disto, muito mais informações podem ser obtidas com análise direta imediata, tanto do Gram quanto das células recolhidas, ampliando assim o rendimento diagnóstico. Para a maioria dos autores que utilizam a técnica broncoscópica, o LBA é realizado imediatamente após o PSB, com risco de complicações em torno a 0,01% a 0,3% (Torres), entre estas a piora transitória das trocas gasosas e o aumento do trabalho cardíaco. Como regra são feitos 5 lavados com 50 ml de soro fisiológico. Os segmentos pulmonares a serem avaliados referem-se, em geral, àqueles com alterações radiológicas ou que mostrem presença de secreção purulenta. Na ausência delas, o LBA é realizado no lobo médio direito ou na línula, locais mais fáceis de se recolher o líquido instilado. Evita-se utilizar anestésicos locais instilados na traquéia visto o efeito bactericida dos mesmos. Entre os requisitos necessários para se obter um LBA adequado incluem-se os comentados a seguir.

#### **Qualidade da amostra a ser examinada**

A melhor forma de assegurar a qualidade da amostra do LBA é o exame das células do líquido obtido de preparações após centrifugação. A presença de mais de 1% de células escamosas (SEC) é evidência de contaminação pela flora orofaríngea.

Kahn<sup>57</sup>, em 1987, demonstrou que a avaliação da qualidade da amostra era fundamental para interpretar a mesma, permitindo a separação daquelas adequadas das

outras contaminadas pelas secreções brônquicas altas e pela flora orofaríngea. Na presença de infecção e culturas quantitativas acima de  $10^5$  ufc/ml, havia sempre um número inferior a 1% de SECs, sendo que a presença de mais de 1% de SEC no líquido de LBA era um indício de contaminação. O mesmo critério foi usado por outros autores<sup>54,56,85,88,91,92,93</sup>.

### **Limiar Diagnóstico**

A definição quantitativa diagnóstica do limiar de infecção para o LBA foi estabelecida por consenso<sup>39</sup> e situa-se no nível de  $10^4$  ufc/ml de amostra, havendo uma variação entre  $10^3$  ufc/ml e  $10^5$  ufc/ml. Entretanto, no LBA, este valor pode depender, também, do volume de líquido instilado, do volume recuperado e da concentração de germes no território amostrado, desde que o paciente não esteja utilizando antibióticos<sup>90,94,95</sup>. Nos pacientes sob antibioticoterapia, o valor inferior a  $10^4$  ufc/ml pode significar tanto ausência de pneumonia quanto supressão do crescimento bacteriano. De outro modo, taxas superiores a  $10^4$  ufc/ml na vigência de antibióticos podem significar tanto a presença de pneumonia com patógenos resistentes quanto uma contaminação por germes das vias aéreas superiores, freqüente nos pacientes com DBPOC grave infectada<sup>89</sup>. Nestes casos, a possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos e suas causas potenciais devem ser levadas em conta pelo médico assistente na tomada de decisões. A especificidade das culturas do LBA em excluir pneumonia bacteriana tem sido limitada, em parte, pela possibilidade de contaminação com bactérias das vias aéreas superiores, que podem ser encontradas em um terço das amostras<sup>58</sup>, através do canal interno do aparelho durante a passagem pelas vias aéreas superiores no paciente em ventilação espontânea, ou pelo tubo traqueal nos intubados. Para tentar minimizar esse fato, Meduri<sup>89</sup> utiliza o LBA protegido, através da passagem de uma sonda pelo fibrobroncoscópio preparada com um tampão do orifício distal e disposta com um balonete que oclui o brônquio do segmento a ser lavado, reduzindo a possibilidade de contaminação do sistema. Com esse sistema, no limiar de  $10^4$  ufc/ml, Meduri obteve sensibilidade de 97%, especificidade de 92%, valor preditivo positivo de 97% e valor positivo negativo de 92% em 46 pacientes com e sem ventilação mecânica e tem sido um dos divulgadores da técnica. O estudo experimental de Johanson<sup>22</sup> em babuínos ventilados e com lesão pulmonar aguda comparou o LBA com o PSB e mostrou que 100% de todas as espécies de bactérias encontradas nas culturas do tecido pulmonar em quantidade significativa ( $10^4$  ufc/g) foram unicamente recuperadas pelas culturas do LBA no mesmo limiar, mas não pelo PSB. Também em humanos, nos

estudos de Kirkpatrick<sup>90</sup>, em pacientes ventilados espontaneamente, em 6 de cada 8 amostras cresceram de uma a quatro espécies bacterianas em concentração de  $10^4$  ufc/ml. Entretanto, quando comparado com diagnósticos de autópsias em pacientes que morreram com suspeita de PAVM, o LBA tem mostrado uma sensibilidade variável das culturas, dependendo da técnica utilizada, do limiar para as culturas quantitativas, do padrão de referência adotado e da população estudada<sup>53</sup>. A melhor sensibilidade parece ser obtida no limiar de  $10^3$  ufc/ml, e a melhor especificidade, em  $10^5$  ufc/ml, no entanto nenhum limiar permite estabelecer que o exame seja suficientemente seguro e discriminante<sup>91,92</sup>.

### **O volume recolhido pelo LBA**

O volume recolhido pelo LBA permite realizar diversas análises microbiológicas e citológicas<sup>39</sup>. Todos os autores propõem que a primeira fração do líquido recolhido deve ser desprezada por representar uma amostra com alta probabilidade de contaminação brônquica, sendo que as amostras subsequentes necessitam ser de pelo menos 5ml para se poder fazer uma análise adequada, devendo as mesmas ser transportadas imediatamente ao laboratório (<15min) em recipientes de polipropileno que impeçam a aderência das células às paredes do frasco.

As análises efetuadas com o líquido de LBA são as seguintes:

- contagem do número total de células;
- determinação do número de células epiteliais;
- contagem de células inflamatórias;
- determinação da presença de bactéria fagocitada (BIC) nos neutrófilos e macrófagos;
- determinação de bactérias extracelulares (BEC);
- determinação de fibras de elastina;
- pesquisa de inclusões virais intracelulares ou de efeito citopático;
- pesquisa de fungos;
- culturas quantitativas.

No *pool* das amostras alveolares obtidas as alíquotas são separadas para várias finalidades: em torno de 50% para citologia, 10% para estudos adicionais e o restante para microbiologia (exames culturais e exame direto bacteriocópico).

Para a contagem do número total de células é necessária uma câmara de Neubauer e, para as demais análises microscópicas, preparações por citocentrifugação. O estudo das células é feito pela coloração de May-Grünwald Giemsa, cuja contagem leva em consideração a porcentagem de cada célula estabelecida em um total de 300 a 400 células. A contagem de neutrófilos e macrófagos contendo bactéria fagocitada é feita juntamente com a contagem de bactérias extracelulares, tanto pelo Giemsa quanto pela coloração de Gram, sendo esta mais útil para precisar as características morfotintoriais das bactérias. Essas amostras necessitam filtração para retirar o muco, citocentrifugação a 600-1000 rpm por 10-20min e, logo após, coloração pelos diferentes métodos. Após o “vórtex” da amostra, as culturas quantitativas podem ser feitas tanto pelo método de diluições sucessivas, que é mais apropriado e mais trabalhoso, quanto pelo método da alça de platina calibrada, mais rápido para estabelecer a contagem correta das colônias<sup>39,85</sup>. O exame do sedimento centrifugado e ressuspensionado em solução salina serve para estudos microbiológicos adicionais, tais como pesquisa de *Clamidia sp.*, *Legionella sp.*, micobactéria, fungos e vírus. A pesquisa de fibras de elastina tem sido considerada útil para diagnosticar pneumonia nosocomial por bacilos Gram-negativos, sendo indicador de necrose do parênquima pulmonar<sup>85,88,89</sup>. Entretanto, essas fibras também são vistas na presença de lesão pulmonar primária ou SDRA, o que é relativamente freqüente nos pacientes com suspeita de PAVM, tornando seu encontro menos específico.

Um resumo sobre o LBA pode ser apreciado em uma revisão sistemática feita por Torres<sup>92</sup> que possibilitou reunir os resultados de 23 séries selecionadas por nível de evidência, englobando o estudo de 957 pacientes num total de 431 episódios de PAVM. As principais resultados dessa revisão foram:

- a sensibilidade do LBA pelas culturas quantitativas varia de 42% a 93%, com média de 73%. A implicação clínica das culturas do LBA é que não são diagnósticas de pneumonia em 25% dos casos;
- a especificidade das culturas quantitativas varia de 45% a 100%, com média de 82%, o que significa que o diagnóstico é incorreto (resultado falso-positivo) em 20% dos casos;
- a detecção de BIC nas culturas do LBA é rápida, específica e com valor preditivo alto;

- somente dois estudos avaliaram a qualidade das amostras pela pesquisa sistemática da presença de células escamosas<sup>51,97</sup>.

Em conclusão: o LBA, em qualquer modalidade técnica, é uma alternativa apropriada para o diagnóstico da pneumonia, possuindo sensibilidade superior e especificidade inferior em relação ao PSB, embora a especificidade possa aumentar com a utilização de lavados com cateteres protegidos segundo a técnica de Meduri. A vantagem do LBA sobre o PSB é a possibilidade de realizar a amostragem de um território pulmonar mais amplo e permitir análises microscópicas diretas que fornecem informações imediatas sobre a existência ou não de infecção através da contagem de bactérias fagocitadas ou livres.

#### **1.2.4 Lavado Broncoalveolar Não-Broncoscópico**

Estas técnicas foram desenvolvidas com o sentido de simplificar a coleta e reduzir custos e a morbidade das técnicas ditas invasivas. Existem dois tipos: a coleta distal protegida e o minilavado broncoalveolar (miniLBA). A primeira, desenvolvida por Rouby<sup>98</sup> e por Brun-Buisson<sup>99</sup>, utiliza um duplo cateter, sendo o cateter interno estéril e protegido da contaminação brônquica durante a inserção pela obturação da ponta com tampão de polietileno-glicol. Após posicionamento às cegas até impactar o brônquio, a rolha de polietileno-glicol é expulsa com a injeção de ar e feitas 2 a 3 aspirações seguidas, quando então o sistema todo é retirado, as secreções recolhidas e a ponta do cateter enviada para cultura. O posicionamento do cateter foi testado e dirige-se em 95% das vezes para as áreas pendentes póstero-inferiores do pulmão direito, onde foi mostrado por Rouby que predominam as lesões pneumônicas em pacientes acamados com PAVM<sup>98</sup>. Esses achados foram posteriormente verificados por outros autores<sup>67,100,101,102,103</sup>, confirmando que o posicionamento às cegas das sondas brônquicas sempre tem maior probabilidade de rastrear os segmentos mais contaminados.

A técnica do miniLBA foi desenvolvida por Rouby e colaboradores<sup>98</sup> e consiste no mesmo sistema de duplo cateter (Combicath-Plastimed) que permite fazer pequenos lavados alveolares com 20 ml de soro fisiológico instilados e aspirados com recuperação em média 5 ml que são então processados da mesma forma que o LBA

clássico. A técnica testada em 59 pacientes em VM por mais de 48h, tendo o miniLBA sido repetido a cada 48h. Os resultados do último miniLBA antes do óbito foram comparados com o exame imediato *post-mortem* em 30 pacientes com PAVM histologicamente provada e em 29 sem infecção pulmonar. Nenhuma amostra apresentou contaminação diversa dos patógenos encontrados no grupo de PAVM, contra 1/3 de contaminação no grupo controle. As culturas semiquantitativas do miniLBA permitiram o diagnóstico com sensibilidade de 80% e especificidade de 65,5%. A maioria dos germes presentes no pulmão (75%) na autópsia foi recuperada pela técnica, independentemente de o lobo analisado corresponder ou não ao local de inserção do cateter. A mesma equipe<sup>103</sup> confirmou seus resultados em um estudo prospectivo com 69 pacientes que faleceram após uma média de 17 dias em VM e tiveram seus pulmões inteiros examinados histologicamente e confrontados com os resultados do mini LBA. Havia lesões de broncopneumonia em 52% dos pulmões examinados, mas somente 65% das amostras por miniLBA tinham culturas positivas e menos de 32% destas com valores maiores de  $10^3$  ufc/ml, sendo impossível definir um limiar de positividade para as culturas por essa técnica. No entanto, 80% dos pacientes estavam sob efeito de antibióticos no momento do óbito, e a presença de tratamento, bem como a distribuição irregular das lesões, podem explicar a variação dos resultados mesmo possuindo a histopatologia. Um dos problemas é o pequeno volume recolhido pelo miniLBA, quando se despreza a primeira fração, o que representa uma limitação da técnica. Papazian<sup>30</sup> repetiu esses resultados, utilizando a histologia e culturas positivas de tecido pulmonar como teste de referência, em 28 pacientes que morreram em VM, comparando os resultados do LBA, do miniLBA e da coleta cega brônquica (BBS). Nesse estudo, o número de falso-positivos e negativos era elevado com as três técnicas, com alguma vantagem da BBS na identificação dos pacientes com pneumonia verdadeira através do exame direto da celularidade das amostras alveolares. Outros autores<sup>79,99</sup> compararam os resultados em um estudo randomizado do miniLBA com a PSB, tendo como referência a evolução dos pacientes (cura ou não da pneumonia), hemoculturas, culturas pleurais ou histologia, sendo que a maioria dos casos estavam em uso de antibióticos. Setenta e quatro por cento dos resultados eram concordantes, sendo o miniLBA mais sensível (100% vs. 66%), mas com menor especificidade (83% vs 93%). O miniLBA é útil também para a obtenção do exame direto, tendo um rendimento semelhante ao do LBA broncoscópico<sup>30,91</sup>. A desvantagem principal é a inserção às cegas, sem se poder direcionar a sonda para coletas dirigidas, havendo dificuldade em posicioná-la para o pulmão esquerdo.

Em conclusão, as técnicas não-broncoscópicas possuem um rendimento comparável aos das broncoscópicas, cuja especificidade é um pouco inferior à do PSB e com sensibilidade similar à do LBA, com a vantagem de poderem ser usadas com maior facilidade e economia, sendo uma alternativa mais prática, menos agressiva e menos dispendiosa para muitos pacientes, quando não se dispõe das técnicas broncoscópicas ou quando as mesmas podem estar contra-indicadas pelas condições do paciente. Entretanto, para os casos em que é necessária uma coleta mais dirigida, como, por exemplo, pesquisa nos segmentos do pulmão esquerdo, dar-se-á preferência às técnicas broncoscópicas.

## **1.3 Exame Direto do Lavado Broncoalveolar**

### **1.3.1 Pesquisa da Bactéria Fagocitada Intracelular**

O interesse do exame direto das secreções broncopulmonares é duplo. Ele propicia uma orientação diagnóstica precoce, para autorizar ou não a antibioticoterapia em primeira intenção, e pode qualificar a amostra obtida eliminando o risco de trabalhar com secreções contaminadas do LBA. As células do exame direto podem ser coradas pelos métodos de Gram, de May-Grunwald-Giemsa e de Grocott, permitindo quantificar os leucócitos, macrófagos, linfócitos e as inclusões bacterianas, reconhecer bactérias, fungos, fibras de elastina e anticorpos bacterianos e identificar o DNA bacteriano pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A eliminação de amostras incorretas é feita pela identificação de células escamosas, e a presença de macrófagos serve como testemunho da origem profunda das secreções<sup>104,105,109</sup>. A BIC pode ser vista tanto em macrófagos alveolares quanto em neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e é considerada um atestado da existência de infecção.

Os testes diagnóstico possíveis pelo exame direto do LBA estão resumidos no Quadro 7.

QUADRO 7 – Análise do exame direto no lavado broncoalveolar

Polimorfonucleares (critérios de purulência)
Bactérias (presença e tipo de germes)
Bactérias fagocitadas (germes infectantes)
Células epiteliais escamosas (células provenientes das vias aéreas superiores)
Fibras de elastina (destruição parenquimatosa)
Genoma bacteriano – PCR (identificação bacteriana)

Fonte: Brégeon e Papazian<sup>91</sup>

Thorpe<sup>83</sup>, em 1987, mostrou a utilidade do exame direto através da coloração pelo método de Gram e das culturas quantitativas na identificação do agente etiológico em pneumonias bacterianas agudas em uma série de 92 pacientes com doenças pulmonares variadas e em 59 pacientes com doença imunossupressiva, onde o Gram (uma ou mais bactérias vistas em um campo de 1.000 aumentos) discriminava os pacientes com pneumonia aguda ativa diagnosticada clinicamente ou pela resposta aos antibióticos. A sensibilidade do Gram comparada ao resultado das culturas era de 73%, e a especificidade, de 100%. Nessa série havia pacientes com e sem VM. Em 8 (21%) dos 59 pacientes com imunossupressão e infiltrados pulmonares, o exame direto pelo Gram foi útil para reconhecer a pneumonia aguda bacteriana posteriormente comprovada.

Chastre e colaboradores<sup>106</sup> foram os primeiros a mostrar o valor diagnóstico da quantificação das BICs para o diagnóstico das pneumonias nosocomiais em VM. No seu trabalho original, a quantificação de germes fagocitados, tanto em neutrófilos quanto em macrófagos alveolares, foi descrita inicialmente em limiares de 25% de BIC, contando 300 células em cada esfregaço, como demonstrativos de infecção pulmonar, usando o PSB como teste referencial para o diagnóstico. Os mesmos autores publicaram, em trabalho posterior<sup>107</sup>, a utilidade do exame direto, em 20 pacientes que morreram em VM, empregando como teste-ouro de comparação a histopatologia e culturas teciduais obtidas *post-mortem* em um período de menos de 72h após o LBA. Os pacientes não haviam recebido novos antibióticos nas últimas 48h. Esse estudo estabeleceu que, com novos limiares de 7% de BIC, a sensibilidade era de 86% e a especificidade variava de 96% a 100% para o diagnóstico de pneumonia. As vantagens da BIC eram propiciar uma leitura rápida, imediatamente após a realização do LBA, permitindo concluir sobre o diagnóstico

de infecção, e iniciar um tratamento antibiótico antes do resultado das culturas que, em geral, demoram 48h ou mais. Aubas<sup>108</sup>, revisando 72 pacientes, mostrou uma percentagem de BIC significativamente maior (média e desvio padrão de  $8,8 \pm 18,1\%$ ) nos pacientes com PAVM, comparados aos sem PAVM ( $0,4 \pm 1,1\%$ ), mas, usando uma curva ROC, não encontrou um limiar diagnóstico discriminativo para a BIC e havia baixa sensibilidade mesmo com limiares de 5%.

Vários autores posteriores têm utilizado e valorizado a pesquisa de BIC para o diagnóstico rápido<sup>39,85,109,110,111,112,113,114,117,118,119,120</sup>. Contudo, ainda persistem dúvidas e controvérsias quanto a sua rentabilidade diagnóstica, na medida em que os resultados possam também ser afetados pelo uso corrente de antibióticos no momento da realização do exame<sup>112,116</sup>. Por outro lado, é salientado o fato de que alguns microorganismos, tais como os germes encapsulados (pneumococo, *Listeria sp.*, etc.), possam ter uma localização preferencial extracelular<sup>38</sup> por serem mais resistentes à fagocitose, o que poderia diminuir a utilidade da BIC nos processos desencadeados por esses agentes, fato que não foi definitivamente estudado. O efeito dos antibióticos encontra opiniões muito variadas entre os autores. Meduri<sup>115</sup> e Sanchez-Nieto<sup>64</sup>, analisando o valor diagnóstico da BIC na PAVM e utilizando métodos de coleta protegida, propõem como ponto de corte para o limiar diagnóstico valores entre 2% a 5% de BIC para distinguir a presença ou não de infecção e consideram que o método é útil e pouco afetado pelo uso de antibióticos. Já Torres e Fabregas<sup>32</sup>, em trabalho em que foram usados LBAs protegidos e não-protegidos cujos resultados foram comparados com os de biópsias pulmonares múltiplas, mostraram uma sensibilidade para a BIC em torno de 60%, mesmo com especificidade de 100%, mas tanto uma quanto a outra caíam significativamente a níveis de 33% e 83%, respectivamente, com o emprego de antibióticos.

O efeito limitante dos antibióticos no encontro de BIC a partir dos LBAs não foi confirmado por Marquette<sup>76</sup>, em estudo de 28 pacientes que morreram com suspeita de PAVM, onde a acurácia dos exames bacteriológicos obtidos por AT, PSB e LBA eram confrontados com a histologia e culturas teciduais *post-mortem* realizados até 72h após o teste diagnóstico. Sempre que o LBA mostrava culturas semiquantitativas acima de  $10^4$  ufc/ml, a BIC era positiva, e em nenhum caso de ausência de pneumonia havia BIC, mas nas culturas de tecido pulmonar em concentrações inferiores a  $10^4$  ufc/g de tecido o encontro de BIC era negativo. Para esse autor, a presença de BIC em qualquer concentração é sempre evidência de infecção, por sua alta especificidade e por não sofrer

influência dos antibióticos. Em outros estudos, feitos por Solé Violán, em 33 pacientes em VM<sup>117</sup>, por Timsit em 161 pacientes com VM e PAVM suspeita<sup>113</sup>, por Pugin<sup>29</sup> em 28 pacientes, por Allaouchiche em 132 pacientes<sup>110</sup> e por Meduri em duas séries de 46 pacientes<sup>89</sup> e de 94 pacientes com SDRA e pneumonia suspeita<sup>115</sup>, totalizando 448 casos avaliados, o uso de antibióticos não afetava de forma importante o encontro de BIC nas amostras alveolares. No Quadro 8 estão resumidos os resultados dos principais autores sobre o rendimento da BIC no diagnóstico da PAVM.

QUADRO 8 – Resumo dos resultados de estudos sobre a BIC entre os principais autores

Autor/ano	N Pac (N PAVM)	Limiar	Sensibilidade	Especificidade	LR +	Ex.referência	Antibiótico	Estudo
Chastre/1988	21 (8)	25%	100%	100%	*	Histo/clin/micro	0	Casos, LBA
Meduri/1991	25 (9)	2%	85%	100%	*	Histo/clin/micro	25	PSB vs PLBA
Pugin/1991	28 (40)	>8%	73%	100%	*	CPIS	?	Casos, LBA vs PLBA
Dotson/ 1993	36 (49)	7%	86%	96%	21,5	clin/micro	36	Casos, PSB vs LBA
Papazian/1993	64 (56)	5%	30%	98%	15	clin/micro	32	Casos, PSB vs LBA
Aubas/ 1994	72 (28)	5%	39%	98%	19,5	clin/micro	?	casos, LBA
Solé-Violán/1994	33 (16)	4%	62%	100%	*	Histo/clin/micro	?	Casos, PSB vs LBA
Vallés/ 1994	41 (18)	5%	89%	100%	*	Histo/clin/micro	?	Casos
Chastre /1995	20 (20)	5%	91%	89%	8,2	Cultura pulmão	2	PM,PSB vs LBA
Marquette/1995	28 (19)	>1%	37%	100%	*	Histo	13	PM, AT,PSB,LBA
Timsit/ 1995	161 (19)	5%	59%	98%	2,95	Histo/clin/micro	65	Random,PSB, LBA
Allaouchiche/1996	132 (56)	2%	84%	80%	4,2	clin/micro	?	Casos, PSB vs LBA
Torres/ 1996	25 (23)	2%	58%	100%	*	Histologia	17	PM,LBA vs PSB
		2%	75%	98%	1	Histologia	17	só com LBA
Papazian/1997	28 (13)	4 a 10%	57 a 60%	54 a 57%		Histo/micro/cult	11	PM, LBA, MiniLBA, BBS
Meduri/1998	94 (40)	2%	46%	93%	6,5	clin/micro	50	Casos com SDRA, LBA
Prekates/2000	75 (22)	>1%	77%	87%	5,9	clin/micro	75	Casos, LBA vs PSB

N Pac= número de pacientes; N PAVM= número de PAVM ; LR += *likelihood* ratio positivo

\*= infinito, ? = não relatado PM = estudo *post-mortem*; PSB = escovado protegido; LBA=lavado broncoalveolar; PLBA = lavado broncoalveolar protegido; miniLBA = minilavado broncoalveolar; SDRA= síndrome da distrição respiratória do adulto; AT= aspirado traqueal.

Nesse quadro, chama a atenção a constante alta especificidade da BIC e o conseqüente alto valor preditivo positivo, independentemente dos demais resultados, sendo este o valor incremental para o diagnóstico mais evidente. O limiar diagnóstico entre os autores varia de 1% a 25%. É possível que as oscilações observadas na sensibilidade do teste sejam decorrentes de questões relacionadas a fatores como forma de coleta das

amostras, uso dos antibióticos e técnica de processamento laboratorial e de leitura das células, que podem afetar o rendimento do teste.

Uma análise dos trabalhos revisados permite supor que, nas coletas de LBA feitas sob uso de antibióticos, os resultados com culturas positivas representariam a existência de resistência bacteriana aos mesmos, pois o antimicrobiano em uso não impede o desenvolvimento da pneumonia<sup>38,76,83,113,116</sup>. Esse cenário é mais freqüente com antibióticos de uso prolongado, administrados por motivos outros que não a pneumonia. Por outro lado, nas coletas feitas por ocasião da introdução de novos antibióticos, ou quando ocorreram trocas recentes (menos de 48h), as culturas e a pesquisa de BIC tendiam a ser negativas, por inibição do crescimento bacteriano. Essas conclusões foram bem demonstradas por Timsit e colaboradores<sup>113,114</sup> que compararam o impacto do tratamento antibiótico no diagnóstico da PAVM obtendo amostras através de PSB e LBA em 96 pacientes com suspeita de PAVM que não receberam antibióticos por um tempo superior a 3 dias no momento das coletas, enquanto 65 pacientes estavam sob antibioticoterapia há mais de 3 dias. A sensibilidade e a especificidade não diferiam entre as culturas do PSB e LBA e na percentagem de bactérias fagocitadas nos pacientes que estavam ou não recebendo antibióticos. Os autores concluíram que, quando os pacientes adquiriam pneumonia enquanto em uso de antibióticos para infecções de origem extrapulmonar, os patógenos eram resistentes aos antibióticos e não afetavam os resultados do PSB e do LBA. Souweine e colaboradores<sup>116</sup> confirmaram e estenderam as observações de Timsit em 63 episódios em que havia suspeita clínica de PAVM, tendo os pacientes sido separados em três grupos de estudo: 12 pacientes sem uso de antibióticos 4 dias antes da broncoscopia; 31 que vinham usando antibióticos por mais de 72h e 20 que haviam iniciado ou tinham modificado os antibióticos em menos de 24h antes da broncoscopia. A sensibilidade do achado de BIC no limiar de 5% foi de 71% nos sem antibiótico, de 50% nos com uso corrente e de 67% nos com troca recente de antibiótico, sem diferença estatística. Nas culturas do LBA a variação foi de 71%, 83% e 38% respectivamente, com maior decréscimo no grupo com troca ou início recente das drogas, mas que era restaurada se fosse reduzido o limiar das culturas do LBA para  $10^3$  ufc/ml. Com base na curva ROC, consideraram que tanto as culturas como a contagem da BIC são testes efetivos para o diagnóstico mesmo com uso de antibióticos. Sugeriram que as coletas para PSB e LBA fossem feitas somente antes de qualquer mudança no regime de antibióticos. Thorpe<sup>83</sup> mostrou que a instalação recente de antibióticos (menos de 24h) negativava o Gram do

LBA em 92 pacientes com suspeita de pneumonia, sendo que, nos sem antibióticos ou em uso crônico, o Gram no exame direto conseguia reconhecer a presença de pneumonia em 81% dos casos. Essa explicação também aparece nos resultados de Dotson<sup>112</sup> que comparou a capacidade discriminatória da BIC para pneumonia em 36 pacientes estratificados quanto ao uso ou não de antibióticos, em uso corrente ou com troca recente (menos de 72h). Em somente 28% dos casos com antibióticos de uso corrente ou trocados com menos de 72h a presença de BIC era preditora de culturas positivas (mais de 10<sup>3</sup> ufc/ml) pelo PSB, ao passo que em 100% dos sem antibióticos a cultura e a BIC eram positivas. Nas suas conclusões, não recomendava a pesquisa de BIC através de LBA em pacientes que estivessem recebendo antibióticos. Entretanto, esse trabalho possui limitações, tais como amostragem pequena de pacientes e mau padrão ouro (PSB) para comparação dos grupos, além da realização das coletas broncoscópicas com emprego de anestésico local endobrônquico que tem efeito bacteriostático comprovado. Kirtland<sup>50</sup>, utilizando amostras comparativas pareadas com estudo histopatológico, também não confirma o bom rendimento da BIC no diagnóstico de pneumonia, mas não informa se houve ou não troca recente de antibióticos antes da coleta. Torres<sup>49,85</sup>, que tem escrito diversos ensaios sobre o tema, salienta a baixa sensibilidade do exame direto e da BIC obtidos por LBA como critério para predizer a presença de PAVM, destacando, porém, sua utilidade na exclusão de pneumonia, quando negativo, em razão da alta especificidade do teste. Meduri<sup>115</sup>, examinando 94 pacientes com SRDS e suspeita de pneumonia, separou os com e os sem uso de antibiótico. A análise mostrou que a sensibilidade da BIC pela coloração do Giemsa era menor (48%) no grupo com antibiótico e que, quando avaliada pelo Gram, era um pouco maior (57%). O autor salienta que, na presença de SDRS, existe menor eficiência da fagocitose e das demais defesas pulmonares contra a infecção. Papazian<sup>109</sup> e Solé-Violán<sup>117</sup> alertam para a baixa sensibilidade do exame direto colhido por LBA, AT, ou por BBS quando comparado ao exame histológico do pulmão inteiro, onde a numeração de bactérias fagocitadas parece ter um interesse limitado devido ao baixo rendimento (baixa sensibilidade), mesmo sem o uso de antibióticos, mas reconhecem que por sua alta especificidade, quando positivos, podem guiar o início da antibioticoterapia. Nesse aspecto, o estudo de Papazian<sup>109</sup> é um dos mais importantes sobre o tema. Nele foi avaliado o rendimento da BIC em 28 pacientes ventilados por mais de 72h que morreram na UTI, cujas amostras (BBS, miniLBA e LBA) foram obtidas logo após o óbito ao mesmo tempo em que os pulmões eram biopsiados ou retirados. Ao comparar a contagem quantitativa das BICs nas várias amostras com o diagnóstico histopatológico e

culturas de pulmão, a contagem de BICs em limiares baixos de 2% a 5% não foi útil para diferenciar a presença ou ausência de pneumonia (sensibilidade de 70% com qualquer técnica) exceto para o BBS. Contudo, o achado positivo de BIC em limiar de 10% identificava pacientes com pneumonia no BBS com sensibilidade de 100% e especificidade de 86%, e o Gram identificava a bactéria responsável em 92% dos casos somente quando o exame direto era possível. Uma limitação desse trabalho foi a rejeição de 54% das amostras por inadequação devido à presença de PMNs degenerados pelo processo de secagem e coloração, tornando impossível uma leitura adequada. Allaouchiche e colaboradores<sup>110</sup>, através de uma curva ROC, concluíram que o limiar de 2% para a BIC apresentava o melhor balanço entre a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico precoce em 56 casos de PAVM diagnosticada por LBA. Entretanto, os mesmos autores, em trabalho mais recente<sup>121</sup>, usando o lavado não-broncoscópico protegido (LBAP) para o diagnóstico precoce, tentaram correlacionar a coloração de Gram de 104 pacientes em VM com as culturas positivas iguais ou acima de  $10^3$  ufc/ml (67 casos), tendo encontrado sensibilidade de 76,2%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 75,5% com boa concordância (86,2%) com o diagnóstico final (*kappa* 0,73). Porém ressaltam que, na análise isolada dos casos com PAVM, a correlação positiva era completa somente em 39% dos casos e parcial em 28%, não havendo correlação em 33% dos casos, o que constitui uma limitação para o diagnóstico rápido da PAVM e para o tratamento empírico. Mimosz e colaboradores<sup>119</sup> obtiveram um resultado diverso ao analisar o Gram no exame direto obtido de amostras protegidas coletadas por PSB e coletas cegas não broncoscópicas em 134 pacientes com suspeita de PAVM e diagnóstico através de cultura positiva superior a  $10^3$  ufc/ml, onde foram obtidas sensibilidade de 74-81%, especificidade de 91-100%, valor preditivo positivo de 91-100% e valor preditivo negativo de 82-88% respectivamente. Para esses autores não havia vantagem em aumentar o número de campos microscópicos de leitura de 10 para 50 usando o Gram, ou em fazer leituras por mais de um examinador para aumentar o rendimento do exame direto no diagnóstico da PAVM. Blot e colaboradores<sup>120</sup> estudaram também o valor da pesquisa pareada do Gram nas secreções respiratórias baixas usando o AT e a coleta não-broncoscópica para o diagnóstico precoce de pneumonia nosocomial em 91 episódios de PAVM. O diagnóstico era obtido pela cultura quantitativa. A sensibilidade do Gram era semelhante considerando tanto o AT quanto o cateter protegido (sensibilidade de 91% e 70% e especificidade de 64% e 96% respectivamente). Através da combinação do alto valor preditivo negativo do Gram no AT e do alto valor preditivo positivo na coleta

endobrônquica, era possível predizer o diagnóstico precoce de PAVM em 2/3 dos casos. A limitação, novamente, desses 3 últimos trabalhos é a ausência de um teste referencial mais consistente para comparar o rendimento das amostras do Gram com um diagnóstico mais confiável de pneumonia.

A quantificação das bactérias fagocitadas é estabelecida sobre a noção de que sua presença testemunha um processo infeccioso ativo. Entretanto, seu valor no diagnóstico rápido está por ser ainda definitivamente demonstrado, conforme visto no relato dos diversos autores. Além do efeito dos antibióticos, questionam-se outros fatores, como a presença simples de uma traqueobronquite que poderia traduzir-se por secreções brônquicas purulentas onde poderia haver bactérias intraleucocitárias. Nesse aspecto, como já foi mencionado, os macrófagos testemunham a origem distal da amostra estudada<sup>105</sup>, portanto é possível que a contagem dos macrófagos infectados seja mais discriminatória do que a presença de PMNs infectados, sendo este um aspecto ainda não devidamente estudado de forma consistente. Salata e colaboradores<sup>38</sup> mostraram que a BIC diferenciava infecção de contaminação em amostras de aspirados traqueais obtidos de vários tipos de pacientes intubados e internados em UTI, incluindo fumantes e os em uso de antibiótico prévio. Sobre a especificidade da pesquisa em neutrófilos ou em macrófagos, os autores não esclarecem a questão de forma definitiva, uns referindo a pesquisa com leucócitos contendo bactérias<sup>29,109,112,117,122</sup>, outros, a pesquisa das partículas de inclusão dos macrófagos vistos no método de Giemsa (Meduri, Brégeon) e outros ainda examinam ambas as células<sup>76,83,107,110,115</sup>. Autores como Chastre<sup>107</sup> e Thorpe<sup>83</sup> propõem a ausência (menos de um), ou a raridade (menos de quatro) de germes extracelulares para distinguir as bronquites das pneumopatias, sendo que para Chastre a presença de leucócitos infectados permite tal distinção. Papazian<sup>109</sup> salienta que a procura de células e sua quantificação devem ser avaliadas inicialmente pelo Giemsa, devido ao fato de ser mais fácil seu reconhecimento do que pelo método do Gram, entretanto propõe que a contagem seja feita nos leucócitos pela dificuldade de diferenciar as bactérias intracelulares de outras partículas intracitoplasmáticas nos macrófagos. Mas, quando o número de leucócitos alterados era superior a 75%, essas preparações eram inadequadas para a interpretação, pela lise dos leucócitos que torna difícil o reconhecimento dos microorganismos. A falta de critérios objetivos também transparece nas recomendações da *American Thoracic Society* (ATS)<sup>63</sup> sobre o uso do LBA em adultos. O diagnóstico de pneumonia é considerado quando são encontradas as inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas nas amostras do

LBA e, quando associadas às culturas quantitativas, são métodos válidos para diferenciar colonização ou bronquite de pneumonia. A mesma opinião oficial foi dada pela conferência de Consenso de PAVM em 1992<sup>39</sup>, embora seja considerada a necessidade de melhores e futuras investigações nessa área. Para a controvérsia entre os autores concorrem certamente as diferenças de metodologia entre os trabalhos publicados, conforme já citado anteriormente. Propõe-se que os estudos subseqüentes devam tentar uniformizar essas questões metodológicas, reunindo um número maior de pacientes avaliados e, sempre que possível, comparados a um padrão de referência (áureo) também uniforme.

Em conclusão, a questão mais importante a ser considerada na obtenção do exame direto e do diagnóstico rápido é também a mesma relacionada ao contexto clínico no momento da realização do exame. Assim, a interpretação dos resultados deve levar em conta os fatores de confusão que podem interferir no seu rendimento. A simples constatação de germes na coloração de Gram poderia autorizar o início do tratamento, sempre que a probabilidade pré-teste for intermediária ou alta. O resultado negativo permite, na maioria dos casos, afastar a infecção ou decidir por nova coleta. Os resultados posteriores da cultura permitirão continuar, interromper ou modificar o tratamento vigente.

Entre as questões que ficam para ser melhor avaliadas estão: a influência eventual da quantidade de líquido injetado e recolhido nos LBAs (considera-se um mínimo de 5ml recolhidos para a eficácia das culturas quantitativas), a técnica do processamento e diluição na execução do teste no laboratório, as vantagens e desvantagens das diferentes colorações para bactérias intra e extracelulares e os valores operacionais exatos do exame citológico nos diferentes contextos clínicos.

### **1.3.2 Considerações sobre a Importância da Citologia no Exame do Escarro**

Da mesma forma com que destacamos o valor da citologia para o diagnóstico de infecção nas amostras coletadas por via endobrônquica, seria útil traçar um paralelo com as características citológicas do exame do escarro expectorado, já que a traquéia é a via natural de saída das secreções respiratórias.

Tradicionalmente o teste do Gram no exame direto e a cultura do escarro são os exames mais frequentemente solicitados para se estabelecer a etiologia das infecções do trato respiratório inferior. Apesar do uso corrente dessa prática, a análise do escarro fornece resultados confiáveis em menos de 50% dos casos de pneumonias comunitárias<sup>124,125,130</sup> e tem valor ainda mais limitado nas infecções respiratórias nosocomiais, devido à colonização freqüente com bactérias potencialmente patogênicas. As amostras do escarro devem ser colhidas antes do uso de antibióticos e ser transportadas ao laboratório rapidamente, em menos de 1 hora, já que um tempo maior até o processamento influencia os resultados. A comunicação entre microbiologista, patologista e clínico é essencial para se obterem bons resultados.

As características das células inflamatórias do escarro foram demonstradas e ilustradas já em 1926 por von Hoesslin, citado por Geckler<sup>124</sup>, mas ficaram pouco valorizadas por mais de meio século. A análise prévia da citologia do escarro antes de processar as culturas é recomendada como forma de assegurar a origem das amostras como provenientes das vias aéreas inferiores. A padronização foi feita por Chodosh<sup>132</sup>, usando uma lâmina com a amostra espalhada através de uma alça de arame e examinada em microscópio em campo de baixo aumento (x 10) em preparação seca ou fixada como para o Gram, onde podem ser vistas células epiteliais escamosas, esfoliadas da cavidade oral e faringe e facilmente diferenciadas das células bronquiolares, alveolares e inflamatórias. Vários escores baseados nas características citológicas têm sido sugeridos para qualificar as amostras de escarro, entre eles o de Bartlett<sup>127</sup> e o de Murray, Washington e Geckler<sup>128</sup>, que mostram que 10 ou mais células epiteliais escamosas (SEC) por campo de pequeno aumento são inaceitáveis para cultura, independentemente do número de leucócitos e macrófagos alveolares presentes e indicariam contaminação excessiva da orofaringe. Essas determinações foram baseadas em trabalhos que comparavam a citologia com análise microbiológica em pacientes com e sem evidência objetiva radiológica de pneumonia. A exceção seria o processamento da amostra na suspeita ou no encontro de *Mycobacterium tuberculosis* ou de fungos no exame direto, cuja presença é altamente específica<sup>129</sup>. Na análise do Gram com 1.000 aumentos e imersão em óleo, os campos não devem conter qualquer célula escamosa, e sim várias células inflamatórias ou provenientes da árvore traqueobrônquica. Na pneumonia por Gram-positivos o encontro de mais de 25 granulócitos e de menos de 10 células escamosas por campo de pequeno aumento resulta em culturas com rendimento semelhante ao do aspirado traqueal<sup>135</sup>. Baigelman<sup>132</sup>

recomenda que o encontro de mais de 8 *S. pneumoniae*, mais de 12 *H. influenzae* ou mais de 18 *Moraxella sp.* em campo de imersão de grande aumento no escarro separa casos com exacerbação aguda bacteriana de infecção brônquica de outros grupos tais como colonização, recuperação de infecção aguda e exacerbação alérgica aguda. Rein<sup>125</sup> verificou que a presença de 10 ou mais diplococos Gram-positivos por campo de imersão predizia o isolamento de pneumococo nas culturas de escarro em 90% das vezes. Mesmo em casos de pneumonia pneumocócica provada, onde a coleta de escarro foi rigorosamente supervisionada e controlada para o exame por Gram, havia 38% de resultados falso-negativos. A sensibilidade do Gram de escarro em pacientes com pneumonia por *S. pneumoniae* situa-se em torno de 50% a 60% e a especificidade é superior a 80%, usando a hemocultura e a avaliação da qualidade do escarro (>25 PMN e <10 células escamosas em campo de baixo poder) como padrão-ouro de referência<sup>136</sup>. Moreira e Petrillo<sup>137</sup> mostraram que o exame direto do escarro permite identificar e distinguir as células oriundas da orofaringe e aquelas das vias aéreas inferiores e que as bactérias associadas a essas células devem também vir do mesmo local onde tais células se originaram. Assim, o teste do Gram seria útil para avaliação dos casos de pneumonia comunitária, fato não levado em consideração nos últimos consensos de pneumonia comunitária. Mas já não teria o mesmo rendimento para pneumonias causadas por bacilos Gram-negativos, onde podem ser encontradas quantidades significativas (mais de 10<sup>7</sup> ufc/ml de bacilos Gram-negativos) em indivíduos com propensão para aspiração como alcoolistas crônicos ou com doença neurológica e pacientes internados em UTIs<sup>133,134</sup>. Em muitos casos, não se obtém o escarro para exame, mas, mesmo em pacientes que produzem escarro, existe 75% de chance de que a amostra seja de má qualidade e contaminada pela flora oral, e outra limitação é o fato de os pacientes estarem recebendo antibióticos antes da coleta. Assim, somente 40% das amostras de escarro em pneumonias comunitárias são consideradas válidas para análise segundo esses critérios, e a validade depende também da experiência do examinador. Em 80% dos pacientes imunocompetentes hospitalizados com pneumonia existe formação de escarro e o exame do mesmo é sempre útil para diferenciar de outras etiologias tais como *H. influenzae*. Apesar dessas evidências desencorajadoras, a obtenção do exame do escarro adequado permanece a única amostra disponível no primeiro dia de atendimento de pacientes com pneumonia para o médico encarregado de tratá-los e muitas decisões são tomadas baseadas nos seus resultados.

## 1.4 Testes de Referência para o Diagnóstico de Pneumonia Nosocomial

O teste ideal para o diagnóstico da pneumonia nosocomial e da PAVM deve possuir sensibilidade, especificidade e valores preditivos elevados, ser acessível, aplicável de forma não invasiva e repetitiva e de baixo custo. Visto dessa forma, esse teste ainda não existe, sendo que as técnicas atuais utilizadas para diagnosticar PAVM (dados clínicos, radiologia, aspirados traqueais, técnicas broncoscópicas e não-broncoscópicas) não permitem avançar no diagnóstico além dos limites do provável (provável pneumonia). O diagnóstico de certeza, segundo os critérios atuais, necessita de biópsia pulmonar, ou da presença de cavitação pulmonar, ou hemoculturas positivas concordantes com exames de escarro, o que representa muito mais situações de exceção do que a realidade vigente. Esses critérios estão mais voltados para a padronização da linguagem e uniformização dos estudos clínicos e das publicações do que para o auxílio do médico no manejo dos pacientes.

Após a conferência de Memphis, em 1992<sup>39</sup>, passaram a ser considerados como testes padrão-ouro para o estudo da PAVM a histopatologia e as culturas de tecido pulmonar. No entanto, mesmo nos poucos estudos clínicos com exames *post-mortem*, existem problemas metodológicos que podem dificultar a correta interpretação dos resultados, tais como: as diferenças de tempo entre as coletas endobrônquicas e o momento da biópsia; o uso ou não de antibióticos previamente à coleta; a ausência da avaliação de qualidade das amostras (se alveolar ou somente brônquica); o pequeno número de pacientes em cada série e o fato de os testes-padrão serem realizados somente nos casos mais graves, ou seja, naqueles pacientes que morrem. A avaliação restrita somente aos casos mais graves pode não ser representativa para os demais que sobrevivem. Para os autores, o tempo máximo entre as coletas endobrônquicas e a biópsia pulmonar não está ainda definitivamente fixado, com opiniões que variam de 3 a no máximo 5 dias<sup>97,104,109</sup>, o que parece exagerado.

A histopatologia da pneumonia tem várias fases<sup>22</sup>: após a agressão infecciosa inicial com mobilização dos fagócitos e ativação de resposta inflamatória, ocorre a lesão tecidual, com acúmulo e concentração de células inflamatórias (PMN e macrófagos), tanto nos bronquíolos quanto nos espaços alveolares e intersticiais, que evolui em focos isolados

ou em espaços confluentes associados ou não à destruição da arquitetura pulmonar, seguida de regeneração. A classificação histológica atualmente empregada pelos autores<sup>32,47</sup> por sua praticidade, utiliza a classificação em 4 graus ou níveis de acordo com a fase evolutiva do processo pneumônico: Grau 0 – parênquima normal; Grau 1 – discreta ou precoce, consistindo em pequenos focos de bronquiolite ou acumulação de PMN junto aos capilares; Grau 2 – moderada ou intermediária, onde existem focos de pneumonia localizada com PMN, macrófagos, fibrina e alguns eritrócitos preenchendo o lúmen alveolar; Grau 3 – severa ou avançada com confluência dos focos e intensa proliferação do conteúdo inflamatório nos espaços alveolares com desarranjo e destruição da arquitetura pulmonar, podendo ou não haver abscedação do parênquima e envolvimento pleural com empiema. Para a demonstração histológica e estabelecimento diagnóstico definitivo de pneumonia são aceitos somente os níveis 2 (pneumonia focal) e 3 (confluente com ou sem abscedação). A variabilidade da distribuição das lesões na PAVM pode trazer dificuldades na obtenção da prova histológica quando realizada através de punção-biópsia por agulha (transparietal ou endobrônquica), mesmo quando orientada por radiologia. A PAVM, sendo um processo de distribuição irregular e, geralmente, bilateral, compromete principalmente as áreas pendentes e mais profundas do pulmão e apresenta fases evolutivas diferentes ao mesmo tempo em até um mesmo lobo pulmonar. Os estudos clínico-patológicos com avaliação do pulmão inteiro<sup>22,32,47,51,109</sup> demonstraram a complexidade da utilização da histopatologia como teste padrão-ouro, quando são empregadas somente biópsias do pulmão para confirmar o diagnóstico. No trabalho de Fabregas<sup>32</sup>, com retirada dos pulmões inteiros logo após o óbito, para estudo histológico e microbiológico, a histologia dos pulmões mostrou a concomitância de pneumonia histologicamente moderada e severa com lesões mínimas de bronquiolite. Em 35% dos casos havia pneumonia com cultura tecidual negativa, principalmente nos pacientes que faziam uso de antibióticos (80%). A biópsia pulmonar superficial e localizada, de 1cm<sup>3</sup>, perdia 25% dos casos de pneumonia, mostrando sua limitação como teste definitivo (falso-negativo). Esse estudo, muito citado pelos autores, evidenciou também não haver boa correlação entre histologia e cultura de tecido pulmonar, pois culturas nos limiares de 10<sup>3</sup> ufc/g (estabelecido para diagnosticar pneumonia) existiam tanto na presença de pneumonia histológica quanto na sua ausência, independentemente do uso de antibióticos prévios. Esses achados alertam para o fato de que as culturas de tecido pulmonar não representam uma referência válida para a avaliação dos testes endobrônquicos. Marquette<sup>51</sup> expressa opinião semelhante ao comparar a acurácia de PSB, LBA e AT em 28 pacientes em VM

com suspeita de pneumonia que faleceram até 72h após a realização das coletas, sem troca ou acréscimo de novos antibióticos. O processo pneumônico, confirmado em 18 casos (67%), era mais restrito às regiões mais centrais, ou medulares, de áreas pendentes pulmonares e pouco freqüente nas mais superficiais. Dessa forma, em casos verdadeiros, as zonas superficiais, acessíveis às punções por agulhas, podem não revelar a presença da lesão pneumônica (falso-negativo). Por outro lado, o trabalho de Kirtland<sup>50</sup>, que estudou através de culturas e histologia os pulmões de 39 pacientes em VM prolongada que morreram, concluiu que as culturas teciduais não distinguem a presença ou ausência de pneumonia, não havendo correlação entre histologia e microbiologia. Considera-se, assim, que a cultura positiva do tecido pulmonar não é indispensável para o diagnóstico, pois ela reflete somente a presença de microorganismos intrapulmonares, sem permitir afirmar a presença de infecção parenquimatosa<sup>91</sup>. Faltam, portanto, estudos mais definitivos sobre a questão para que se estabeleçam critérios mais seguros.

Os pressupostos teóricos que sustentam o estabelecimento de limiares diagnósticos para a existência de pneumonia vieram de estudos experimentais e de estudos clínicos que examinavam os pulmões *post-mortem*. Nos trabalhos experimentais de Johanson<sup>22</sup>, a concentração bacteriana mínima para o desenvolvimento de pneumonia histologicamente demonstrada é de  $10^3$  ufc por grama de tecido pulmonar e, nas fases mais adiantadas, sobe para  $10^6$  ufc a  $10^8$  ufc/g. Outros autores também confirmaram esses valores<sup>51,106,107</sup> em amostras de pulmão para cultura.

Dentro da perspectiva clínica, conforme Rouby<sup>47</sup>, a validade desses limiares para a interpretação positiva das amostras brônquicas ( $10^3$  ufc/ml para PSB e  $10^4$  ufc/ml para LBA e miniLBA ) não foi demonstrada quando as mesmas eram correlacionadas com a irregularidade da distribuição evolutiva da PAVM. A fixação do limiar único para o diagnóstico de pneumonia não se justifica, pois a concentração bacteriana tecidual varia conforme o estágio evolutivo (focal, confluyente ou abscedida), a área rastreada pela coleta e o uso de antibióticos. A interpretação de cada resultado precisa levar em consideração não somente o limiar de concentração bacteriana mas também o método empregado, o contexto clínico, a fase da pneumonia e o uso de antibióticos. Torres<sup>56,85</sup>, Fabregas<sup>32</sup> e Marquette<sup>51</sup> referem que o rendimento diagnóstico das diferentes técnicas (AT, PSB, LBA) é de valor limitado e aconselham, conforme já salientado por Rouby<sup>47</sup>, estabelecer um balanço entre o julgamento clínico e os resultados microbiológicos para decidir entre o melhor manejo dos pacientes com PAVM.

Outra dificuldade é a possibilidade de variação inter e intra-observadores na interpretação da histopatologia pulmonar entre diferentes patologistas, conforme demonstrado por Corley e Kirtland<sup>138</sup> que, em 1997, realizaram um estudo de 39 pacientes em VM que morreram, vistos independentemente por quatro patologistas, que encontraram prevalências diferentes de pneumonia com uma variação de 18% a 38%. O reestudo das lâminas 6 meses após resultou na reclassificação para pneumonia de 6 casos previamente julgados como tendo ausência de pneumonia histológica. Os autores destacam a necessidade de padronização dos critérios histológicos desde as fases iniciais até as mais avançadas.

A obtenção do teste histológico através de biópsia transparietal por agulha, tanto realizada às cegas como guiada por radioscopia, em geral, não se aplica ao paciente em VM, devido à possibilidade de complicações freqüentes e severas, como hemoptise e pneumotórax. Além disso, os riscos do procedimento não justificam sua realização, tendo em vista, como já explicado acima, a baixa sensibilidade (43%) quando realizada por agulha fina<sup>49</sup>. A biópsia por toracotomia aberta acrescenta a possibilidade de se obterem vários fragmentos guiados pelo aspecto macroscópico dos pulmões e tem sido mais utilizada em infecções de pacientes imunodeprimidos, na busca de infecções fúngicas, virais ou de causas não infecciosas. Nos pacientes em VM, ela poderia se aplicar nos casos com insucesso terapêutico associado à negatividade das culturas usuais. Sua realização necessita da colocação de drenagem pleural sistemática com as implicações decorrentes desta medida.

### **Considerações sobre o estabelecimento do teste-padrão**

1) O teste-ouro, no caso o exame histopatológico, deve idealmente ser feito ao mesmo tempo em que forem realizadas as coletas endobrônquicas, condição difícil de se obter na prática clínica diária. Assim, o entendimento correto das correlações entre os dois resultados (histopatológico e endobrônquico) tem maior chance de acontecer a partir de estudos experimentais.

2) A PAVM é um processo de evolução irregular, onde coexistem fases precoces e avançadas da doença, às vezes concomitantes em um mesmo lobo pulmonar. Assim, as concentrações bacterianas também variam, dependendo do segmento estudado e da fase da infecção.

3) Fica difícil estabelecer um limiar diagnóstico único nas culturas quantitativas para diferenciar infecção de colonização, pelos motivos expostos anteriormente.

4) São necessários outros critérios, em que a melhor perspectiva é um modelo probabilístico que contempla o quadro clínico e radiológico, hemoculturas (probabilidade pré-teste), a presença de bactéria fagocitada ou extracelular nas amostras alveolares e o resultado da cultura quantitativa, levando em consideração o uso recente, a troca (<72h) ou o emprego prolongado de antibióticos.

5) As culturas de tecido pulmonar têm restrições e não possuem boa correlação com o grau histológico da pneumonia, mesmo nos pacientes não submetidos à antibioticoterapia.

## **1.5 Justificativa para o Estudo Experimental**

Os argumentos expostos demonstram a dificuldade diagnóstica para se estabelecer com segurança a presença de pneumonia em pacientes hospitalizados submetidos à intubação traqueal ou à VM, tendo-se em vista os inúmeros fatores que interferem na correta adequação e interpretação dos testes disponíveis, dentre os quais sobressai o efeito de antimicrobianos sobre as técnicas de coleta intrabrônquica que afetam significativamente o rendimento das mesmas.

Das várias técnicas atuais, o LBA é uma das mais utilizadas e estudadas. No entanto, resta ainda a necessidade de uma melhor avaliação do rendimento do exame direto do LBA como fator de diferenciação diagnóstica. Embora as vantagens da informação precoce propiciada pelo exame direto sejam destacadas pelos vários autores, faltam ainda estudos mais definitivos que permitam estabelecer correlações entre a citologia do exame direto com as culturas quantitativas e a histopatologia pulmonar na presença de pneumonia. Se a BIC é testemunha de um processo infeccioso ativo, o seu valor incremental para o diagnóstico não foi ainda totalmente demonstrado. Os aspectos que necessitam melhor avaliação são: a sensibilidade do teste e a concordância da pesquisa da

BIC em macrófagos ou em neutrófilos, o limiar de positividade que melhor contribui para o diagnóstico e o efeito dos antibióticos sobre a BIC comparado ao dos exames culturais.

Neste estágio de conhecimento, a realização de estudos experimentais auxiliará na obtenção de informações melhor controladas da viabilidade de associar a fagocitose como marcador da presença de infecção em várias situações de pneumonia tendo como teste referencial o estudo do pulmão inteiro. Com este objetivo, no presente trabalho desenvolveu-se nos últimos 2 anos um modelo de pneumonia em roedores, onde se estudou o rendimento do LBA no diagnóstico da pneumonia em animais tratados e não-tratados com antibióticos.

A maioria dos estudos animais de pneumonia tem sido realizada através da provocação ou da inoculação intrabrônquica de bactérias. Tal modelo, embora com algumas limitações, permite obter o desenvolvimento de pneumonia de forma padronizada, o que é útil para reproduzir as várias fases do processo pneumônico e assim testar os exames diagnósticos de forma mais controlada e ideal. Na impossibilidade de se dispor atualmente de animais com VM prolongada, decidiu-se utilizar o modelo experimental no rato adulto, inoculando bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas em doses capazes de desencadear infecção intrapulmonar com sobrevida dos animais. Nessa fase, estudou-se o desempenho diagnóstico dos exames direto e citológico obtidos por LBA na pneumonia induzida sob o efeito ou não dos antibióticos. Pelo estudo controlado de suas fases e das análises histopatológicas de pulmão inteiro como padrão-ouro de referência, pode-se comparar o rendimento das técnicas diagnósticas obtidas do LBA em várias simulações, visto ser esta a questão mais difícil de ser obtida nos estudos clínicos em humanos.

Para tanto, tornou-se necessário padronizar cada fase do modelo experimental: o tipo de inóculo capaz de desencadear pneumonia de forma reprodutível; o tempo de evolução da pneumonia no roedor; a caracterização histopatológica das fases evolutivas da pneumonia no rato; a metodologia de LBA; a semeadura e leitura das culturas quantitativas e a forma de diluição das amostras para leitura citológica.

## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESES**

## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESES**

### **2.1 Objetivos**

#### **2.1.1 Geral**

Testar o rendimento do exame direto, citológico e microbiológico, nas amostras de lavado broncoalveolar como critério diagnóstico de pneumonia, utilizando um modelo experimental em ratos.

#### **2.1.2 Específicos**

- Desenvolver modelos experimentais de pneumonia causadas por cocos Gram-positivos e por bacilos Gram-negativos em ratos.
- Obter, a partir dos modelos experimentais, a definição histopatológica das várias fases evolutivas do processo pneumônico como teste referencial da sua presença.
- Comparar e correlacionar, nos grupos de animais estudados, os achados citológicos das amostras de lavado broncoalveolar com os resultados microbiológicos e histopatológicos testando sua sensibilidade, especificidade e valores preditivos.
- Testar e estabelecer o rendimento diagnóstico da citologia nas amostras broncoalveolares em grupos de ratos com pneumonia tratados e não-tratados com antibióticos.

- Analisar separadamente o rendimento diagnóstico do encontro da bactéria fagocitada tanto em neutrófilos quanto em macrófagos presentes nas amostras de lavado broncoalveolar.
- Estabelecer em números percentuais o melhor limiar discriminativo da bactéria fagocitada para o diagnóstico de pneumonia.

## **2.2 Hipóteses Gerais de Trabalho**

1. A análise do exame direto nas amostras de lavados broncoalveolares possui sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo elevados na presença de pneumonia.
2. O rendimento do exame citológico é menos afetado do que o das culturas quantitativas quando o lavado broncoalveolar é realizado na vigência de antibióticos.
3. Existindo resistência aos antibióticos empregados, o rendimento do exame direto não se altera.
4. A presença de bactéria fagocitada no lavado broncoalveolar é sinal inequívoco da presença de pneumonia.

### **3 METODOLOGIA**

### **3 METODOLOGIA**

O trabalho vem sendo desenvolvido, desde 1998, no Laboratório de Cirurgia Experimental de Pós-graduação da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Para sua efetivação foi necessária a colaboração dos Serviços de Patologia e Microbiologia da mesma Faculdade, sendo os Exames Citológicos realizados no Laboratório do Instituto de Pesquisas Diagnósticas (IPD) do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, além de contar com a participação ativa de 4 acadêmicos da FFFCMPA com bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O estudo seguiu as normas internacionais de experimentação em animais vivos e o protocolo de estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FFFCMPA.

Este trabalho experimental foi previsto com seu desenvolvimento em 3 fases metodológicas: Na Fase I, foi feito o estudo da viabilidade do modelo experimental e sua padronização com respeito à determinação dos inóculos bacterianos na produção de pneumonia; à técnica do lavado broncoalveolar e ao processamento das amostras para estudo diagnóstico. Na Fase II, efetuou-se o estudo randomizado, comparado e controlado, do rendimento diagnóstico do LBA em grupos tratados e não-tratados com antibióticos na presença de pneumonia; A Fase III está prevista, na continuidade – em etapa posterior –, com a aplicação do estudo diagnóstico em animais submetidos à VM.

O presente estudo refere-se à execução e aos resultados das Fases I e II.

### **3.1 Fase I: Desenvolvimento e Padronização do Modelo Experimental de Pneumonia em Ratos – Observação dos Efeitos do Inóculo Bacteriano Comparados com os do Inóculo Estéril e Estudo da Viabilidade Diagnóstica através das Amostras Alveolares**

Nesta fase, foi desenvolvido um modelo de pneumonia em ratos a partir da inoculação intratraqueal de bactérias vivas, sob anestesia. Após inoculados, os animais eram acordados e mantidos livres em gaiolas separadas, sendo sacrificados em períodos de 24 a 120h após a inoculação. O lavado broncoalveolar era realizado logo após o sacrifício, obtendo-se amostras para estudo microbiológico e citológico, sendo, a seguir, retirados os pulmões para avaliação da macroscopia e histopatologia.

As características do modelo experimental que serviram para a efetivação do experimento foram padronizados nesta fase e foram as seguintes:

#### **3.1.1 Animal de Experimentação**

Ratos Wistar adultos, imunocompetentes, com peso entre 220 a 350g, mantidos em gaiolas individuais isoladas dos demais animais, por períodos diários de 12h de luz, sob fluxo aberto de ar e temperatura ambiental, com rações padronizadas e água livre. Os aspectos “clínicos” dos animais (atividade, estado de alerta ou letargia, aspecto do pêlo, anorexia e emagrecimento, taquipnéia ou dificuldade respiratória, presença ou não de secreções respiratórias) eram observados e anotados no momento da inoculação, diariamente e logo antes do sacrifício.

#### **3.1.2 Inóculo**

A escolha e a determinação da concentração do inóculo basearam-se nos trabalhos de Toews<sup>143</sup>, com culturas de bactérias vivas, onde foram testadas as concentrações bacterianas capazes de desenvolver pneumonia em animais de experimentação e roedores. Foram testadas 2 cepas representando dois modelos de

pneumonia: uma com cocos Gram-positivos (*Streptococcus pneumoniae*) e outra com bacilos Gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa*) escolhidos, por serem dois microorganismos patogênicos para o rato e fáceis de serem obtidos em laboratório:

a) *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3, oriundo de amostras patogênicas de pneumonia com hemoculturas positivas em humanos, foi mantido em suspensão em solução contendo leite desnatado (Skim Milk; Difco laboratories, Detroit, MI, USA) a 10% e glicerol a 10% (solução SMG). A amostra foi caracterizada como *Streptococcus pneumoniae* por métodos convencionais (susceptibilidade à optoquina, bile solubilidade e caracterização sorológica inicial com soro polivalente – Ruoff, 1995). Para a sorotipagem foi empregado o teste do entumescimento capsular (reação de “Quellung”), com uso de anti-soros específicos preparados no CDCP de Atlanta, USA, e seguindo-se o esquema dinamarquês de nomenclatura. Os tubos contendo a suspensão foram colocados em congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  (revco Scientific Inc., Asheville, NC. USA).

Para o manuseio das amostras, os tubos foram retirados do congelador e mantidos na temperatura ambiente para o descongelamento. A seguir foi feita a semeadura em placas de Petri contendo ágar-soja-tripeticaseína (Oxoid Unipath Ltd. Hampshire, England) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24h em atmosfera de  $\text{CO}_2$  obtida pelo método da vela. Posteriormente, as amostras foram semeadas em caldo Todd-Hewitt e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 4 a 6h, até a obtenção de uma suspensão bacteriana com  $1 \times 10^9$  ufc/ml. Esta suspensão foi empregada para inocular os animais. Antes da escolha da concentração final de  $10^9$  ufc/ml para prosseguir o estudo, foram testadas inicialmente concentrações crescentes de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  e  $10^{10}$  ufc/ml, cujos resultados estão em outro trabalho<sup>139</sup>.

b) *Pseudomonas aeruginosa* patogênicas, não mucóides, que foram obtidas a partir de amostras oriundas de isolado clínico de humanos, conservadas como suspensão em solução de leite desnatado (semelhante à descrita para o pneumococo). A amostra para o estudo foi caracterizada como sendo *Pseudomonas aeruginosa*, por método de identificação automatizada (Sistema Dade MicroScan, com painéis do tipo Negative Combo 21) e mantida em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para o manuseio das amostras os tubos foram tratados à semelhança do descrito para o pneumococo, sendo as placas incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24h e, a partir do desenvolvimento das colônias, foi preparada a suspensão com  $1 \times 10^8$  ufc/ml em soro fisiológico pronta para inoculação. Para a escolha

desta concentração como a adequada para o experimento foram testadas, em etapa anterior, concentrações crescentes de  $10^6$ ,  $10^8$  e  $10^9$  ufc/ml.

### **3.1.3 Técnica de Inoculação Bacteriana Endobrônquica**

Os ratos foram anestesiados com éter inalado e logo após realizava-se a intubação orotraqueal com cânula plástica Abocath n.14, sendo instilado 0,6ml do inóculo bacteriano endobrônquico através de uma segunda cânula mais fina passada pelo lúmen da primeira cânula e até impactar distalmente no pulmão direito, quando então era recuada em poucos milímetros para permitir a injeção do inóculo. Logo em seguida injetava-se 0,4ml de ar, mantendo os animais em posição vertical através da elevação da cabeceira até acordarem, para facilitar a migração distal do inóculo por gravidade e impedir a sua regurgitação. As cânulas traqueais eram, a seguir, removidas. Após, os animais eram deixados em posição normal pronada e colocados isolados em suas gaiolas com movimentação, alimentação e água livres até o sacrifício. Na Fase II os animais foram todos inoculados por traqueostomia cirúrgica em lugar da intubação orotraqueal, pois verificou-se que esta técnica evitava a regurgitação parcial do inóculo, observada na Fase I, prejudicando a provocação da pneumonia.

### **3.1.4 Período de Observação**

Na primeira fase do trabalho e de desenvolvimento do modelo, este período variou de 24h a 120h, observando-se a capacidade de sobrevivência dos animais à provocação da infecção, sendo anotadas as taxas de sobrevida cumulativa diária e o desenvolvimento das várias fases evolutivas da pneumonia. A partir da Fase II os animais eram observados diariamente e sacrificados em 48h pós-inoculação, pois verificou-se que este período era suficiente para se obter pneumonia histologicamente comprovada na sua fase mais aguda, tanto para pneumococo quanto para *Pseudomonas*.

### **3.1.5 Sacrifício dos Animais**

Sempre feito através de dose letal de 3ml de tiopental 2,5%, 5 mg/kg injetados intraperitoneal. Logo após os sinais de sedação profunda (em 2 a 3 minutos) era feita uma abertura no abdômen e provocada a morte por exsanguineação através da secção da aorta abdominal.

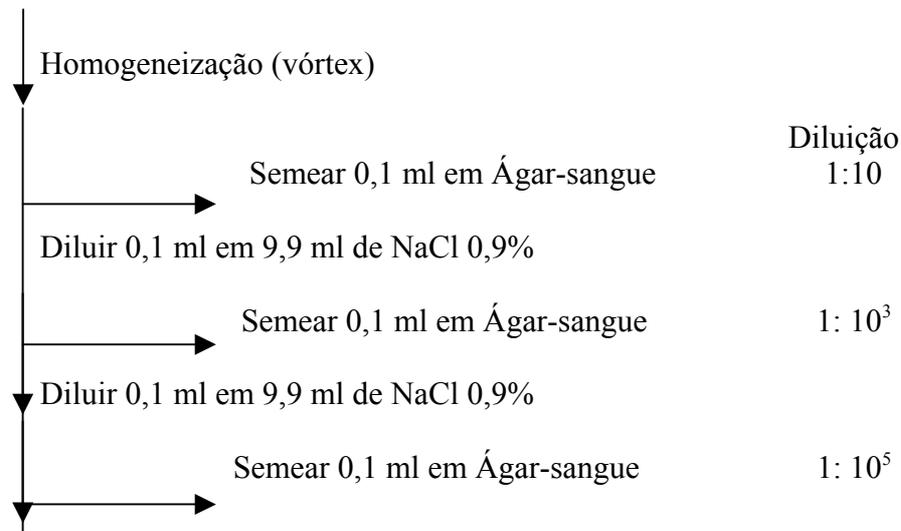
### **3.1.6 Técnica do Lavado Broncoalveolar e Retirada dos Pulmões**

Imediatamente após o óbito era aberto o tórax, inspecionada a cavidade torácica quanto à presença de exsudatos pleurais e pericárdicos e à macroscopia dos pulmões. Logo após era canulada a traquéia com cânula plástica fina que progredia até impactar o brônquio segmentar, geralmente no lobo inferior direito. Procedia-se, então, ao LBA, injetando-se 5 frações de 2,5ml de soro fisiológico estéril seguidas de aspiração imediata. A primeira amostra era sempre desprezada por ser considerada passível de contaminação com secreções brônquicas. A quantidade de líquido recuperada era anotada e recolhida separadamente em 2 frascos estéreis, sendo a fração inicial enviada imediatamente para o setor de microbiologia e as 3 frações subseqüentes juntadas e enviadas imediatamente para o laboratório de citologia (Figura 1). A seguir era realizada a retirada em bloco dos pulmões, livres da traquéia, coração e grandes vasos, após o que eram pesados (Figura 2) e então fixados em formalina a 10% neutra tamponada por um período não inferior a 48h. Após esse período, os pulmões eram encaminhados ao setor de patologia para inclusão em parafina e para serem cortados em cortes finos de 2 micrômetros e corados tanto pela hematoxilina-eosina quanto pelo método de Gram. Na Fase I, foram feitas biópsias do pulmão direito, onde mais freqüentemente se instalava a pneumonia, em zona correspondente à metade do lobo médio. As amostras eram recolhidas em frasco estéril e encaminhada ao setor de microbiologia, onde eram imediatamente pesadas, homogeneizadas e semeadas em meio de cultura para quantitação da concentração bacteriana tissular pulmonar. Posteriormente, face aos resultados muito irregulares dessas culturas, não se continuou com esta técnica, e, na Fase II, decidiu-se pela preservação da integridade dos pulmões retirados e pela realização de estudos de morfometria dos lobos pulmonares, medindo-se a extensão da área consolidada.

### 3.1.7 Técnica de Processamento das Amostras do Lavado Broncoalveolar

a) Exame microbiológico: as amostras foram encaminhadas imediatamente para o setor de microbiologia, onde foi empregado o esquema de diluição para cultura quantitativa, adaptado de Baselski e Wundering<sup>60</sup>, conforme esquema abaixo:

#### Amostra de Lavado Broncoalveolar



As placas semeadas com as respectivas diluições foram incubadas a 35°C durante 18 a 24h em atmosfera de CO<sub>2</sub> obtida pelo método da vela. Após esse período de incubação, as placas foram inspecionadas para detecção de morfotipos coloniais compatíveis com *S. pneumoniae* ou *P. aeruginosa*. As colônias com morfotipo compatível com o patógeno foram quantificadas e o cálculo do número de unidades formadoras de colônias/ml foi feito com base no esquema das diluições acima:

b) Exame citológico: as amostras do segundo frasco foram encaminhadas imediatamente ao setor de citologia para processamento imediato: as alíquotas eram submetidas à citocentrifugação (Citospin, Shandon Elliot, London UK) 1000 rpm por 10 min, após o que as lâminas eram retiradas e secadas em estufa por 5 min, ficando prontas para coloração pelo método de Max-Grunwald-Giemsa e pelo método de Gram. A leitura das lâminas era feita em microscopia (campo de 1.000 aumentos com imersão em óleo), sendo realizada a contagem percentual diferencial dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos e a pesquisa de bactérias fagocitadas (BIC) no citoplasma tanto dos neutrófilos PMN

quanto dos macrófagos, primeiramente nas lâminas coradas pelo Giemsa e, a seguir pela coloração do Gram. As leituras foram feitas contando 300 células. A presença de bactéria livre, extracelular (BEC) era anotada somente quando positiva ou negativa nos vários campos de leitura das demais células. As leituras foram feitas por 2 leitores independentes, um usando a leitura em campo aberto e outro usando leitura padronizada, a saber:

1) leitura em campo aberto, contando 300 células em campos sucessivos, sem sobreposição, anotando a presença de BIC em todos os PMNs e macrófagos de cada campo de 1.000 aumentos com imersão em óleo (microscópio Olympus 45, Japão). Para a contagem das células utilizou-se um contador manual diferencial de células;

2) leitura padronizada, onde a contagem do número de bactérias foi feita através de um sistema de análise de imagem de vídeo Image-Pro Plus versão 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Foi utilizado microscópio Zeiss Axiostar com ótica corrigida ao infinito (Zeiss Oberkochen, Alemanha) e uma objetiva planacromática de 100 aumentos, fornecendo imagens com magnificação final de 1.000 aumentos e resolução de 20 *pixels* por micrômetro. As imagens foram digitalizadas através de uma videocâmara Sony DC 14S (Sony Corp. Tóquio, Japão) acoplada a microcomputador padrão IBM-PC equipado com placa de captura Image Pro Plus Capture Kit de 640 X 480 *pixels*, cores de 24 bits. A contagem foi realizada de forma interativa do sistema de análise de imagem com avaliação de número de objetos ajustados à unidade de área<sup>139,140</sup>. Foram contadas 300 células em cada lâmina analisada, sendo os campos escolhidos de forma aleatória e sem sobreposição.

Os dados da contagem de cada campo, nos dois métodos, foram armazenados em planilha Excel (Microsoft, Redmons, EUA) para análise e comparação dos métodos. Cada caso foi identificado unicamente por um número, sendo as características do material desconhecidas pelo observador.

### 3.1.8 Estudo Histopatológico

Os pulmões direito e esquerdo eram seccionados no sentido sagital englobando todo o órgão e os blocos incluídos em parafina, cortados em 2 micrômetros de espessura e corados pelos métodos da hematoxilina-eosina e do Gram. As lâminas eram examinadas por um patologista cegado quanto à codificação das mesmas e dos demais resultados. Pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) a intensidade da pneumonia era classificada de acordo com os critérios de Johanson<sup>22</sup> em 3 níveis para as fases evolutivas da pneumonia, a saber:

- Grau 0 – NORMAL: pulmões normais – ausência de pneumonia; Grau 1 – LEVE: presença de pequenos focos bronquiolite focal, com “*plugs*” e infiltrados neutrofílicos na luz e parede de bronquíolos terminais circundando alvéolos, ausência de sinais inflamatórios no parênquima pulmonar; Grau 2 – MODERADA ou FOCAL: presença dos infiltrados inflamatórios neutrofílicos nos espaços alveolares em lóbulos adjacentes, restritos a uma área determinada e focal dos pulmões; presença também dos tampões mucosos purulentos nos bronquíolos; Grau 3 – SEVERA: presença de intenso infiltrado inflamatório ocupando espaços alveolares extensos e confluentes, juntamente com sinais de lesão e necrose, com destruição de septos alveolares; nesta fase pode haver cavitação e formação de pequenos abscessos pulmonares.

Para efeito de diagnóstico, somente os graus 2 e 3 desta classificação foram considerados como pneumonia, para fins de referência na comparação dos demais resultados, e a classificação final foi baseada na pior categoria observada em qualquer um dos lobos.

Pela coloração do Gram: para cada corte da leitura adotou-se um critério quantitativo, conforme empregado por Salata<sup>38</sup> (para leitura de exames bacterioscópicos em amostras de escarro e LBA), já que não se encontraram outras referências para a interpretação. Desta forma, foram contados o número de bactérias identificadas em cada campo de 1.000 aumentos e imersão em óleo, obedecendo à seguinte escala de concentração bacteriana : a presença de nenhuma bactéria/campo em 10 campos = 0 ou  $<10^2$  ufc; 1 bactéria/campo em 10 campos = 1+ ou  $10^3$  ufc;  $>1$  a 10 bactérias/campo em até 10 campos = 2+ ou  $10^5$  ufc;  $>10$  bactérias/campo em 10 campos = 3+ ou  $10^6$  ufc.

- Contagem percentual de área consolidada: devido ao fato de cada lâmina histológica corada possuir um corte sagital englobando longitudinalmente todo o pulmão direito ou o esquerdo do rato, em cada caso foi utilizado o analisador de imagem (Image Pro Plus) na leitura das imagens de ambos os pulmões, capturadas por *scanner* (programa Genius color page HR6, KYE International Corp. Ontario Cat), com resolução final de 2.400 pontos por polegada. Usou-se o método de mensuração interativa, sendo obtida a área total de tecido amostrado e a área de consolidação pneumônica por seleção de cor e eliminação de áreas inferiores a 2.000 *pixels*. A partir dos resultados foram definidos os percentuais de área consolidada, como medida da extensão do processo pneumônico em cada pulmão, sendo considerado para fins de comparação o maior valor em cada caso (animal), quando havia mais de uma área pneumônica concomitante (Figuras 3 ).

### **3.2 Fase II – Estudo Diagnóstico, Randomizado, Cego e Controlado do Lavado Broncoalveolar em Ratos Inoculados Tratados e Não-Tratados com Antibióticos**

Nesta fase, aplicou-se no modelo experimental descrito acima, a testagem do rendimento diagnóstico do LBA em grupos de animais tratados e não-tratados com antibióticos, iniciados logo após a inoculação endobrônquica de bactérias. Estudou-se o rendimento diagnóstico das amostras do LBA para identificação de pneumonia. Analisaram-se as correlações existentes entre as culturas quantitativas, o exame direto (BIC, BEC, exame diferencial da citologia) com a histopatologia nos dois modelos de pneumonia (pneumocócica e por *Pseudomonas*). Como tratamento antibiótico empregou-se a penicilina procaína em tratamento com dose única ou continuado em doses intermitentes na pneumonia pneumocócica, e a amicacina em doses diárias continuadas na pneumonia por *Pseudomonas*. Sabia-se de antemão que ambos os patógenos eram sensíveis aos antibióticos utilizados. O grupo controle recebia inóculo estéril e os animais eram tratados com água destilada.

Na projeção do estudo levou-se em consideração a incidência de pneumonia obtida na Fase I: 71% dos animais não-tratados na pneumonia por *S. pneumoniae* e 65% na pneumonia por *P. aeruginosa*. O poder da amostra em apontar diferença entre os grupos

foi estimado em 80% para um  $p < 0,05\%$ , resultando um número amostral de pelo menos 10 animais em cada grupo para estabelecer diferença estatística entre as variáveis dos grupos.

Na divisão dos grupos, a partir da inoculação, os animais eram randomizados para tratamento com antibiótico ou placebo administrados a partir da quarta hora após a inoculação, conforme os grupos estratificados abaixo e fluxograma à página 87.

### 3.2.1 Grupos da Pneumonia Pneumocócica

**Grupo A1** (intervenção) = inoculação endotraqueal de *S. pneumoniae* (0,6ml de  $10^9$  ufc/ml) e injeções 12/12h, subcutâneas, de água destilada, iniciadas após 4h da inoculação (**pneumonia pneumocócica e ausência de tratamento**): 18 animais.

**Grupo A2** (intervenção) = inoculação endotraqueal de *S. pneumoniae* (0,6ml de  $10^9$  ufc/ml) e tratamento com dose única de 100.000 UI de penicilina G procaína, subcutânea, 4h após a inoculação (**pneumonia pneumocócica e tratamento mínimo**): 10 animais.

**Grupo A3** (intervenção) = inoculação endotraqueal de *S. pneumoniae* (0,6ml de  $10^9$  ufc/ml) e tratamento continuado com doses de 250.000 UI a cada 12h de penicilina G procaína, subcutâneas, iniciadas 4h após inoculação (**pneumonia pneumocócica e tratamento intensivo**): 10 animais.

**Grupo B1** (controle) = inoculação endotraqueal com meio de cultura estéril e injeções a cada 12h subcutâneas de água destilada (**controle e ausência de tratamento**): 5 animais.

**Grupo B2** (controle) = inoculação endotraqueal com meio de cultura estéril e tratados com injeções cada 12h de penicilina G procaína subcutânea (**controle e tratamento**): 5 animais.

### 3.2.2 Grupos de Pneumonia por *Pseudomonas*

**Grupo P1** (intervenção) = inoculação endotraqueal de *P. aeruginosa* (0,2ml de  $10^8$  ufc/ml) e injeção diária intramuscular de água destilada (**pneumonia por *Pseudomonas* e ausência de tratamento**): 13 animais.

**Grupo P2** (intervenção) = inoculação endotraqueal de *P. aeruginosa* (0,2ml de  $10^8$  ufc/ml) e tratamento com dose diária de amicacina 7,5 mg/kg a cada 24h (**pneumonia por *Pseudomonas* e tratamento contínuo**): 13 animais.

Os leitores dos resultados foram cegados quanto ao significado da identificação dos grupos de animais, havendo sido empregados 2 leitores distintos para a microbiologia, 2 leitores distintos para a citologia e 1 leitor para a histopatologia. O grau de concordância entre as leituras dos resultados da citologia pelos dois métodos descritos foram avaliados através do coeficiente estatístico *kappa*.

### 3.2.3 Variáveis Analisadas

#### a) Quanto aos resultados dos testes diagnósticos:

- Microbiologia: cultura quantitativa com valores expressos em ufc/ml de amostra do LBA.
- Exame direto do LBA: percentual de bactérias fagocitadas intracelulares (BIC) em neutrófilos e em macrófagos; presença ou ausência de bactérias extracelulares (BEC); contagem diferencial em percentuais de neutrófilos, macrófagos e linfócitos; volumes em ml do líquido do LBA injetado e recolhido para cada amostra de microbiologia e citologia.
- Histopatologia: método do HE – classificação de pneumonia em graus de intensidade (0, 1, 2, 3); método do Gram – contagem quantitativa de bactéria tecidual por campo de 1.000x; contagem percentual de área consolidada por morfometria; alterações macroscópicas e peso dos pulmões.

**b) Quanto ao comportamento clínico dos animais:**

Peso inicial e final dos animais; quantidade de alimento consumido em g; quantidade de água consumida em ml; aspectos clínicos (óbito, astenia, adinamia, pêlo eriçado, sofrimento respiratório, secreção respiratória).

### **3.3 Coleta dos Dados e Tratamento Estatístico**

**Análise Descritiva:**

Iniciou-se com uma análise descritiva caracterizando a amostra estudada apresentada através de tabela, cujos dados foram tabulados em formulário próprio e planilha eletrônica (Microsoft Excel) e analisados pelo programa SPSS 8.0 for Windows.

**Análise Comparativa de Variância:**

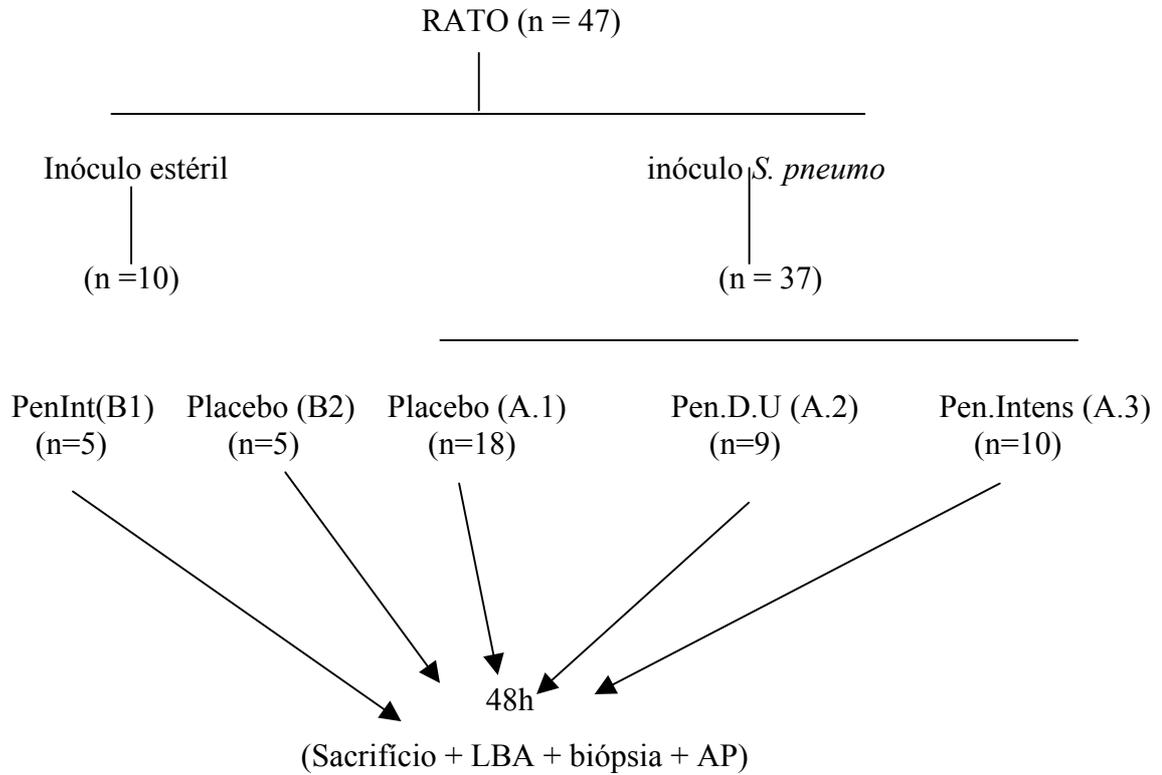
As variáveis do estudo foram analisadas entre os grupos de animais com pneumonia (tratada e não tratada) e o grupo de animais sem pneumonia (controles). As variáveis numéricas, discretas ou contínuas foram comparadas através de testes de médias e desvios padrão por Análise de Variância (ANOVA) com teste de Bonferroni para identificar em que grupos se encontravam as diferenças significativas. Foram utilizados testes não paramétricos correspondentes quando as variáveis não apresentavam distribuição normal (Kruskal Wallis). Foram considerados significativos os achados com valor de  $p < 0,05$ .

**Análise de Sensibilidade e Especificidade:**

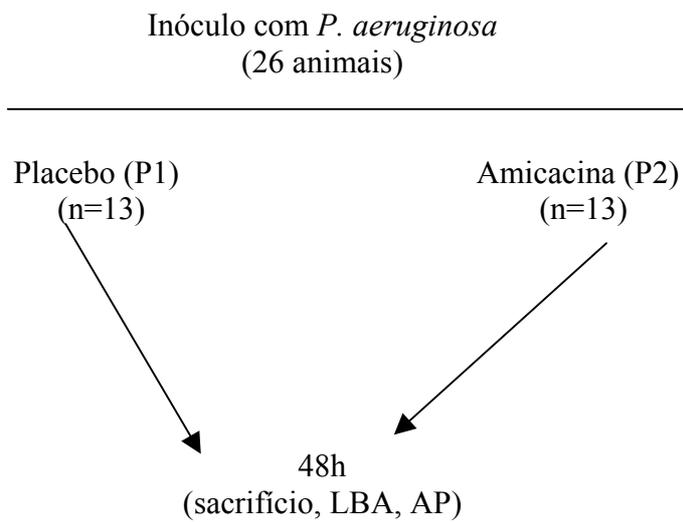
A análise de sensibilidade e especificidade foi realizada para identificar o melhor ponto de corte das variáveis estudadas para o diagnóstico de pneumonia usando métodos padrões pela equação de Bayes. Utilizou-se como padrão-ouro o diagnóstico histopatológico do tecido pulmonar caracterizado através de 4 graus de severidade (ausente, leve, moderado e severo) o qual foi transformado em uma variável dicotômica indicando presença (graus moderado e severo) e ausência de pneumonia (graus ausente e

leve). Foram comparadas com este padrão-ouro as seguintes variáveis do estudo: culturas quantitativas (Micro); bactéria fagocitada intracelular (BIC) em macrófagos e neutrófilos; bactéria extracelular (BEC); número percentual de macrófagos, neutrófilos, linfócitos; número percentual de 50% de neutrófilos. As culturas quantitativas foram categorizadas em 4 pontos de corte:  $10^2$  ufc/ml,  $10^3$  ufc/ml,  $10^4$  ufc/ml e  $10^5$  ufc/ml, e a BIC nos limiares de 2%, 5%, 7% ou mais. Para todas as estimativas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos estimaram-se os intervalos de confiança de 95% correspondentes. Foram feitas comparações por correlação simples e regressão linear entre os resultados da citologia e culturas do LBA com o percentual de área com consolidação pneumônica medida por morfometria. O grau de concordância entre resultados diagnósticos dos métodos de leitura microscópica aberto e padronizado foi avaliado pela determinação do coeficiente *kappa*, sendo que *kappa* próximo de 1 indicava alto grau de concordância entre os métodos.

### Fluxograma (Pneumococo)



### Fluxograma (Pseudomonas)



## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Modelo Experimental

Na Fase I, foram testados a viabilidade e a reprodutibilidade do modelo experimental utilizando diversas concentrações de inóculos bacterianos, desde  $10^5$  ufc/ml até  $10^{10}$  ufc/ml, tendo-se verificado que concentrações inferiores a  $10^6$  ufc/ml não eram capazes de produzir pneumonia clínica e histologicamente detectável e que o inóculo era rapidamente eliminado e a infecção superada pelos animais após 4h. Para o *S. pneumoniae* serotipo 3, a inoculação de 0,6ml na concentração de  $10^9$  ufc/ml produzia pneumonia severa aguda, sem levar à morte precoce dos animais, permitindo assim sua padronização para o estudo. Para a *P. aeruginosa*, o inóculo testado e escolhido foi o de 0,2ml com  $10^8$  ufc/ml pelos mesmos motivos, constatando-se que concentrações superiores provocavam a morte prematura dos ratos. Os animais, em uma primeira fase, foram observados tanto nas alterações do comportamento clínico quanto nos aspectos da patologia pulmonar até o quinto dia pós-inoculação, após o que foram estabelecidas as primeiras 48h como aquelas suficientes para realizar os estudos diagnósticos na fase mais aguda da pneumonia. Foram estudados, ao total, 159 ratos entre infectados e controles: 79 na indução de pneumonia pneumocócica, 7 dos quais morreram precocemente; 54 na indução da pneumonia por *Pseudomonas*, com 5 óbitos precoces, e 26 animais controles para todas as fases do experimento. Dessas séries se formaram os grupos de estudo, após a padronização do modelo, sendo 37 animais no grupo da pneumonia pneumocócica, 26 no grupo da pneumonia por *Pseudomonas* e 10 no grupo controle. O critério de exclusão nas respectivas séries foi a ausência de dados completos para o estudo, tanto pela perda como pela inadequação de amostras para leitura por defeitos no processamento citológico ou bacteriológico.

Nos dois grupos com pneumonia pneumocócica tratados com doses diferentes de penicilina (A2 e A3), não foram percebidas diferenças significativas nos resultados dos exames microbiológicos, citológicos ou histológicos, razão pela qual decidiu-se reuni-los em um único grupo para comparação com os grupos não-tratado e controle.

Na Tabela 1 são mostrados todos os casos nos grupos de estudo, com os respectivos resultados dos exames diagnósticos: histopatologia pulmonar, culturas quantitativas e exame citológico.

TABELA 1 – Grupos de animais testados e seus principais resultados

CASO	PD Grau n (%)	PE Grau n (%)	MICRO ufc/ml	BIC macro (%)	BIC neutro (%)	BEC n	Macrófagos (%)	Neutrófilos (%)
A1.1	3 (55,8)	1 (8,9)	10 <sup>2</sup>	25	27,5	1	36	62
A1.2	3 (82,2)	0	10 <sup>5</sup>	14	12	1	9	90
A1.9	3 (92,3)	0	10 <sup>5</sup>	27	35	1	27	70
A1.10	3 (85,4)	0 (3,9)	10 <sup>5</sup>	30	33	1	37	59
A1.11	3 (63,5)	1 (3,6)	10 <sup>3</sup>	6,4	45	2	41	55
A1.12	3 (68,6)	3 (38,8)	10 <sup>5</sup>	35	19	1	32	68
A1.13	3 (72,6)	1 (1,1)	0	18	9	1	39	57
A1.14	3 (42,2)	0 (2,2)	0	26	16	1	56	41
A1.15	3 (75,6)	0 (1,8)	0	12,5	5,5	2	13	86
A1.16	3 (28,8)	0 (1,8)	10 <sup>3</sup>	1,5	2	2	50	47
A1.17	3 (28,3)	0	10 <sup>3</sup>	7,5	3,4	2	51	47
A1.18	0 (1,1)	3 (80,0)	10 <sup>3</sup>	5,7	5,3	2	44	51
A1.24	3 (54,8)	0	10 <sup>5</sup>	25	28	2	30	70
A1.26	3 (83,2)	0	10 <sup>5</sup>	18	14,5	2	46	54
A1.27	3 (46,0)	0	10 <sup>5</sup>	3,8	12,5	1	35	60
A1.29	3 (78,0)	3 (47,8)	10 <sup>5</sup>	30	10,7	1	45	50
A1.32	3 (94,8)	2 (29,5)	10 <sup>5</sup>	16,5	16,5	1	20	76
A1.40	3 (79,8)	0	10 <sup>5</sup>	5	7,2	2	80	45
A2.1	3	0	10 <sup>3</sup>	6	2	2	31	64
A2.2	3 (23,5)	1 (2,8)	0	3,3	2,9	2	16	80
A2.3	3 (74,5)	0 (1,8)	0	1,8	1,5	2	22	76
A2.6	0 (1,1)	3 (56,8)	0	6,7	2	2	36	72
A2.7	3 (42,8)	0	0	3,2	2,5	2	67	31
A2.8	3 (88,9)	1	0	2	3	2	57	40
A2.9	3 (80,5)	1 (3,5)	0	5	3	2	36	62
A2.10	3 (65,4)	3 (12,5)	0	1,8	1	2	67	24
A2.11	3 (47,2)	0	0	2	2	2	45	53
A3.1	3 (32,6)	0 (2,8)	0	1,6	0	2	10	71
A3.2	3 (31,2)	0 (4,8)	0	0	0	2	18	70
A3.5	3 (69,7)	3 (22,8)	10 <sup>4</sup>	4	3	1	30	68
A3.6	1 (1,8)	3 (95,2)	0	3	3,2	2		
A3.7	3 (29,8)	0 (1,2)	10 <sup>3</sup>	4	2	2	38	61
A3.8	3 (64,2)	0 (2,3)	0	2,6	2,4	2		
A3.9	3 (52,2)	0 (4,1)	0	1,6	1,7	2	68	31
A3.10	3 (51,6)	0 (5,6)	10 <sup>4</sup>	0	0	2	69	28
A3.11	3 (51,6)	0 (1,8)	0	0	0	2	40	58
A3.12	3 (40,6)	0 (1,6)	0	0	0	2	66	31
B1.1	1 (2,0)	1 (1,6)	0	0	0	2	66	30
B1.2	1 (39,6)	1 (10,6)	0	0	0	2	50	34
B1.3	0 (1,4)	0 (2,0)	0	0	0	2	76	9
B1.4	0 (2,4)	0 (1,2)	0	0	0	2	49	45
B1.5	0 (5,6)	0	0	0	0	2	50	48
B2.1	0 (2,8)	0 (2,2)	0	0	0	2	57	33
B2.2	0	0	0	0	0	2	57	41
B2.3	0 (1,8)	0	0	0	0	2	68	30
B2.4	0 (3,6)	0 (4,2)	0	0	0	2	77	21
B2.5	0 (3,2)	0	0	0	0	2	79	21

TABELA 1 – Continuação

CASO	PD Grau n (%)	PE Grau n (%)	MICRO ufc/ml	BIC macro (%)	BIC neutro (%)	BEC n	Macrófagos (%)	Neutrófilos (%)
132	2 (1,2)	1	10 <sup>3</sup>					
136	2 (22,4)	0	0	8	3,5	1	21	78
137	0	3 (24,4)	10 <sup>2</sup>	8,2	5,7	2	34	66
141	3 (24,8)	1 (6,4)	10 <sup>4</sup>	3,4	2,9	2	20	72
143	3 (36,8)	2 (8,2)	0	0	0	2	28	68
145	3 (26,6)	2 (8,2)	0	0	0	1	31	63
147	3 (28,8)	1 (5,2)	0	0	0	2	68	30
149	3 (12,8)	0 (2,8)	10 <sup>2</sup>	2,9	1	2	54	40
151	3 (46,4)	0 (2,2)	10 <sup>4</sup>	5,1	3,3	1	32	63
152	3 (34,2)	3 (96,6)	10 <sup>5</sup>	5,2	8	1	30	66
154	0 (52,8)	3	0	7,2	1,4	2	68	31
109	2 (3,8)	1 (5,0)	0	0	0	2	58	39
113	3 (6,8)	2 (5,4)	0	6,9	2,2	2	17	83
123	3 (2,8)	0 (3,1)	0	2,5	0	1	45	50
133	2 (5,2)	0	10 <sup>4</sup>					
138	3 (47,6)	0	10 <sup>3</sup>	5,5	3,3	2	42	58
140	2 (36,2)	0	0	1,4	0,3	2	27	70
142	3 (39,4)	3 (15,6)	0	1,8	0	2	65	30
144	2 (8,6)	2 (6,8)	0	1,6	3,5	2	43	40
146	3 (8,6)	0	10 <sup>2</sup>	3,2	3,7	1	41	53
148	3 (29,0)	3 (69,8)	0	2,1	2,4	2	37	71
150	3 (14,2)	3 (1,2)	10 <sup>2</sup>	8	5,9	1	30	62
153	3 (58,4)	2 (4,8)	0	7	5,5	2	55	44
155	3 (38,5)	1 (2,8)	10 <sup>2</sup>	9	3,7	2	58	39
156	3 (78,4)	0	10 <sup>5</sup>	19,6	25	1	30	68
108	2 (0,0)	0 (1,6)	0	0	0	2	68	30
114	3 (4,2)	3 (9,5)	0	8,5	3,5	2	28	68
118	2 (8,1)	2 (6,1)	0	5	4,5	2	31	68

PD – pulmão direito

PE – pulmão esquerdo

Grau n – intensidade da pneumonia

Grau (%) – percentual de área consolidada

Micro – cultura quantitativa em ufc/ml

BIC macro – % de BIC em macrófagos

BIC neutro – % de BIC em neutrófilos

BEC – bactéria extracelular

Na Tabela 2 vê-se que os animais com pneumonia tiveram maior perda de peso corporal, a qual foi mais acentuada nos grupos com pneumonia pneumocócica, com valores médios de 26,4g e 17,5g comparados aos de 11,5g e 15,0g no grupo *Pseudomonas*, e 6,1g nos controles. Por outro lado, os animais no grupo “pneumococo” apresentaram-se mais doentes do que os do grupo “*Pseudomonas*”, refletido pelo maior emagrecimento e menor consumo de água e de alimentos. Outros elementos do aspecto físico dos animais também observados, tais como prostração, adinamia, pêlo arrepiado e presença de secreções nasais, não estão tabulados. As quantidades em volumes amostrais recolhidos por LBA para exames microbiológicos e citológicos foram iguais entre os grupos, evitando que esse fator pudesse influenciar o rendimento das análises.

TABELA 2 – Comparação por médias e desvio padrão da diferença de peso corporal, consumo de água e alimento e volumes amostrais do lavado broncoalveolar entre os grupos tratado e não-tratado nos dois modelos de pneumonia

Variável*	Pneumococco		<i>Pseudomonas</i>		Controles n = 10	P
	Não- Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não- Tratados n= 13	Tratados n = 13		
Diferença na perda de peso (g)	26,4 ± 12,3**	17,5 ± 5,7**	11,5 ± 13,4**	15,0 ± 15,0**	6,1 ± 3,3	0,0001
Consumo de água (ml)	25,5 ± 19,7**	39,5 ± 21,6	55,7 ± 39,8	60,0 ± 61,2	56,5 ± 27,7	0,004
Consumo de alimento (g)	9,8 ± 12,6**	6,7 ± 5,1**	34,2 ± 58,6	17,9 ± 24,4	21,6 ± 9,6	0,0001
Volume micro (ml)	2,3 ± 0,5	2,6 ± 1,0	2,2 ± 0,5	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,5	0,2
Volume/cito (ml)	7,3 ± 1,0	6,8 ± 1,2	6,6 ± 1,2	7,0 ± 1,7	7,1 ± 0,9	0,9

\* Resultados apresentados em média ± desvio padrão; \*\* comparações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,050$  em relação ao grupo controle (testes: ANOVA/Bonferroni). Volume micro e cito = quantidade em ml do volume recuperado do LBA.

## 4.2 Pneumonia Pneumocócica e por *Pseudomonas*

### 4.2.1 Histopatologia

Pneumonia pneumocócica: Todos os animais inoculados com  $10^9$  ufc/ml, tratados e não-tratados com penicilina, desenvolveram pneumonia no grau 3, sendo

unilateral em 32 casos e bilateral em 5. A extensão do processo pneumônico nos pulmões foi mensurada por morfometria e as comparações entre os subgrupos de animais foi feita pelo valor mais elevado em cada caso. Assim, no caso de pneumonia bilateral, se no pulmão direito a área de consolidação atingia 75% e no esquerdo 23%, era contado somente o valor de 75%. Os valores médios da área consolidada no subgrupo não-tratado atingiram  $67,5\% \pm 20,5$  e, no subgrupo tratado,  $55,5\% \pm 20,8$ , sem diferença estatística entre eles, contra  $2,4\% \pm 1,5$  nos controles, este com um  $p < 0,0001$  (Gráfico 1).

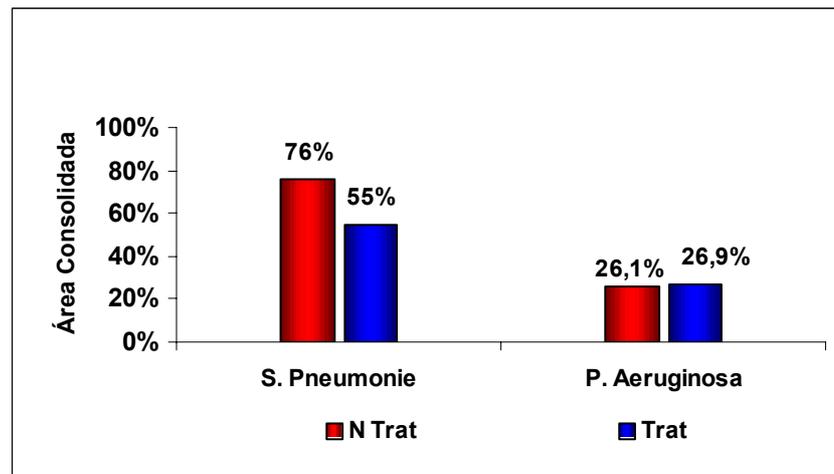


GRÁFICO 1 – Percentual de área consolidada delimitada por morfometria nos dois modelos de pneumonia, mostrando maior extensão da área consolidada no modelo com *S pneumoniae*, comparado ao com *Pseudomonas aeruginosa*

O padrão histopatológico predominante foi o de pneumonia lobar, alveoloductal supurativa, com preenchimento dos bronquíolos terminais e dos espaços alveolares pelo exsudato inflamatório. Nas fases mais precoces, havia congestão dos capilares alveolares e exsudação alveolar de eritrócitos e fibrina e alguns polimorfonucleares e macrófagos (fase de hepatização vermelha); nas fases mais avançadas, além de fibrina havia acúmulo intenso de polimorfonucleares e de macrófagos na seqüência (fase da hepatização cinzenta). Nos casos mais severos e intensos, havia desestruturação da arquitetura alveolar e formação de microabscessos (Figuras 4 a 13).

Pneumonia por *Pseudomonas*: 11 dos 13 animais (84,6%) não-tratados com amicacina desenvolveram pneumonia de grau 3, e 2 animais (15,4%), pneumonia de grau 2, sendo em 9 casos unilateral e em 4 bilateral. Entre os 13 animais tratados, 10 (77%) apresentaram pneumonia de grau 3, e 3 animais (23%), de grau 2, sendo 7 de envolvimento

bilateral. A extensão do processo pneumônico medido por morfometria da área consolidada não mostrou diferenças entre o subgrupo P1 (não-tratado), com média e desvio padrão de  $26,1\% \pm 25,2$ , e o subgrupo P2 (tratado) com  $26,9\% \pm 25,9$ . Essas áreas de consolidação são menos extensas do que as da pneumonia pneumocócica (Gráfico 1).

O tipo histológico predominante foi o de focos de consolidação broncopneumônica de distribuição mais irregular, com afluxo de polimorfonucleares e macrófagos nos espaços alveolares, congestão capilar e presença freqüente de áreas de necrose do parênquima associadas a hemorragias e exsudato fibrinoso. Em poucos casos era possível ver a formação de aglomerados de bactérias junto às áreas de necrose. Era freqüente a presença de intensa hiperplasia reativa precoce do epitélio alveolar com proliferação de pneumócitos 1 e 2 (Figuras 14 a 19).

No grupo controle nenhum animal desenvolveu pneumonia.

A coloração pelo método de Gram para tecidos foi utilizada na tentativa de obter um método alternativo às culturas de tecido para avaliar a densidade da impregnação bacteriana tecidual, considerado, pelos microbiologistas, um padrão-ouro da presença de pneumonia. Não tendo sido encontradas maiores referências técnicas a respeito do método, verificou-se que a leitura das lâminas é trabalhosa, exigindo percorrer muitos campos. Acresça-se a isso a dificuldade de acertar a coloração, sendo necessários cortes finos e corantes novos em cada preparação, pois a tendência de precipitação dos pigmentos nos tecidos, criando artefatos, dificulta a leitura. Neste sentido, a leitura para *Pseudomonas* foi considerada mais difícil do que para o pneumococo e, em muitos casos, não se conseguiu, com a microscopia óptica convencional, distinguir a célula bacteriana, razão pela qual não estão sendo apresentados os resultados definitivos.

A presença de pneumococo era vista somente em áreas onde havia intensa consolidação inflamatória parenquimatosa, no seu grau 3, predominando em áreas mais periféricas dos pulmões e aparecendo tanto intracelularmente, no citoplasma dos fagócitos, quanto extracelularmente, no interstício do parênquima pulmonar e nos espaços alveolares. Em áreas com menor grau de reação inflamatória não se encontravam bactérias (Figuras 20 a 21).. A *Pseudomonas* era vista mais escassamente em forma de aglomerados de bactérias, principalmente nas áreas de necrose do parênquima .

## 4.2.2 Microbiologia

Pneumonia pneumocócica: As culturas quantitativas realizadas nas amostras de LBA no subgrupo não-tratado tiveram valores mais elevados, em média ( $5,5 \times 10^5$  ufc/ml), do que as do subgrupo tratado ( $1,1 \times 10^3$  ufc/ml) (Gráfico 2). O limiar de positividade decidido para o valor igual ou superior a  $10^3$  ufc/ml foi observado em 14 dos 18 casos não-tratados, resultando em sensibilidade de 77,8% e especificidade de 100%. Neste subgrupo (A1), em 3 casos subsequentes (A1.13; A1.14; A1.15) as culturas foram negativas mesmo com pneumonia histológica. Em 10 casos (55,6%) os valores das culturas situaram-se acima de  $10^5$  ufc/ml. No subgrupo tratado com penicilina, a positividade das culturas decrescia acentuadamente, tanto nos animais tratados com dose única quanto nos com doses contínuas, onde somente 4 de 19 animais (21,1%) tiveram culturas positivas (casos A2.1 e A3.7 com  $10^3$  ufc/ml e casos A3.5 e A3.10 com  $10^4$  ufc/ml). Os valores gerais (acurácia) das culturas quantitativas no LBA para a pneumonia pneumocócica, considerando todos os animais com pneumonia (tratados e não-tratados), ficaram em 59% (S=48,6%; E=100%; VPP=100%; VP=52,6%) (Tabela 3).

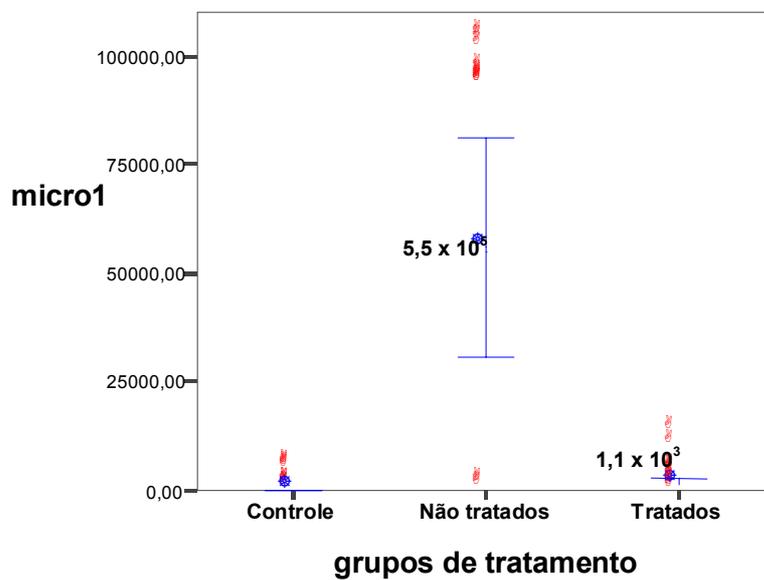
Pneumonia por *Pseudomonas*: Em contraste com o observado na pneumonia pneumocócica, o tratamento com amicacina não resultou em diferenças nos valores médios das culturas quantitativas entre os subgrupos não-tratados e tratados, com média de  $8,0 \times 10^3$  ufc/ml no P1 e de  $7,1 \times 10^3$  ufc/ml no P2 (Gráfico 3). Entretanto, a sensibilidade do exame para o diagnóstico de pneumonia com limiar diagnóstico de  $10^3$  ufc/ml foi muito baixo: 28,6 % no P1 e 21,4% no P2. Por esse motivo, reduzindo o limiar para valores de  $10^2$  ufc/ml, já que havia pneumonia comprovada em todos os casos, a sensibilidade sobe para 42,8%, igual em ambos os subgrupos. A acurácia das culturas quantitativas nesse limiar, contando todos os casos com pneumonia, ficou em 58% (S=42,8%; E=100%; VPP=100%; VP=30%), conforme a Tabela 3, mostrando que as culturas quantitativas são de valor limitado para detectar o diagnóstico de pneumonia nesses casos.

Os animais controles apresentaram resultados culturais negativos em todos os casos.

A capacidade de predição das culturas quantitativas positivas (acima de  $10^3$  ufc/ml) para a presença de pneumonia, representada pelo percentual de área consolidada, foi medida por regressão linear simples. A equação de regressão para estimação de

pneumonia pneumocócica era: pneumonia (consol.) =  $41,736 + 3,5 \times 10^{-4} \times \text{Micro} (10^3)$ , e o coeficiente de correlação positiva foi de  $r=0,483$  ( $p<0,001$ ). Para pneumonia por *Pseudomonas*: pneumonia (consol.) =  $20,99 + 6,6 \times 10^{-4} \times \text{Micro} (10^3)$ , e o coeficiente de correlação positiva foi  $r=0,551$  ( $p<0,001$ ).

**Grafico 2 - Comparação dos valores das culturas quantitativas em animais tratados e não tratados com pneumonia pneumococica**



**Grafico 3- Comparação dos valores de culturas quantitativas em animais tratados para pneumonia por Pseudomonas**

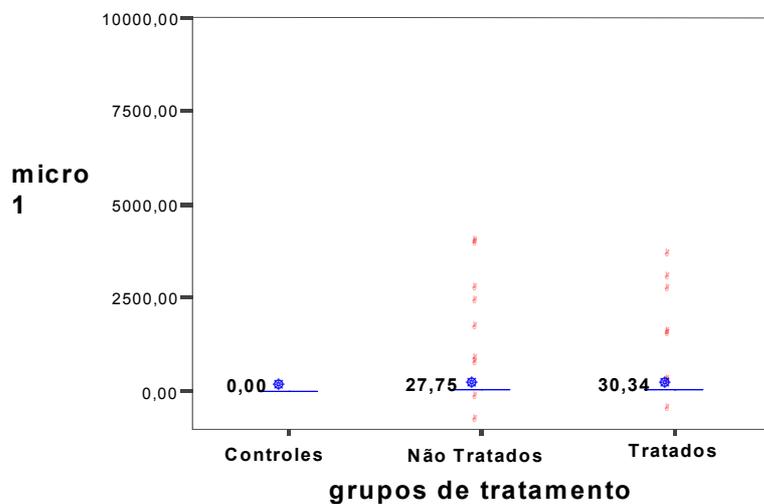


TABELA 3 – Rendimento das culturas quantitativas ( $10^3$  ufc/ml) no lavado broncoalveolar

Variável*	Pneumococco		Pseudomonas	
	Não-Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não-Tratados n = 13	Tratados n = 13
Sensibilidade ( IC 95%)**	77,8 (51,9 – 92,6)	21,0 (7,0 – 46,1)	28,6 (9,6 – 58,0)	21,4 (5,7 – 51,2)
Especificidade (IC 95%)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)
Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	100,0 (73,0 – 100,0)	100,0 (39,6 – 100,0)	100,0 (39,6 – 100,0)	100,00 (31,0 – 100,0)
Valor Preditivo Negativo (IC 95%)	71,0 (51,9 – 92,6)	40,0 (21,8 – 61,1)	50,0 (27,8 – 72,1)	47,6 (26,4 – 69,7)

\* Resultados para cada grupo comparado ao grupo controle; \*\* Intervalo de confiança de 95%.

### 4.3 Exame Direto do Lavado Broncoalveolar

#### 4.3.1 Bactéria Fagocitada Intracelular e Bactéria Extracelular

Pneumonia pneumocócica: No subgrupo dos não-tratados, o encontro de BIC no limiar de 2% foi visto em todos os 18 casos e, em limiares de 5%, em 16 deles (89%). O valor médio para a BIC foi de  $17,05\% \pm 9,3$  neste grupo (Gráfico 4). Praticamente não havia diferença entre a leitura em macrófagos ( $S = 94,4\%$ ) e em neutrófilos ( $S = 100\%$ ). A presença de BEC foi vista em 10 casos (55,6%), sendo todos menos um (caso A1.15) em animais com BIC acima de 10%. No subgrupo dos tratados, o valor médio da BIC foi de  $2,56\% \pm 2,1$  e somente 11 dos 19 casos foram positivos para BIC de 2%, e a sensibilidade decrescia para 57,9%. Nesse subgrupo somente 2 casos mostraram BIC com limiar acima de 5% e apenas 1 caso (A3.5) tratado com doses continuadas de penicilina teve BEC positiva (5,3%). Considerando todos os casos com pneumonia (tratados e não-tratados) e BIC positiva no limiar de 2%, obteve-se uma acurácia de 82% para a BIC, cujo rendimento diagnóstico ficou em:  $S=78,4\%$ ;  $E=100\%$ ;  $VPP=100\%$ ;  $VPN=55,5\%$  e um LR+ calculado ao infinito (Tabelas 4 e 5).

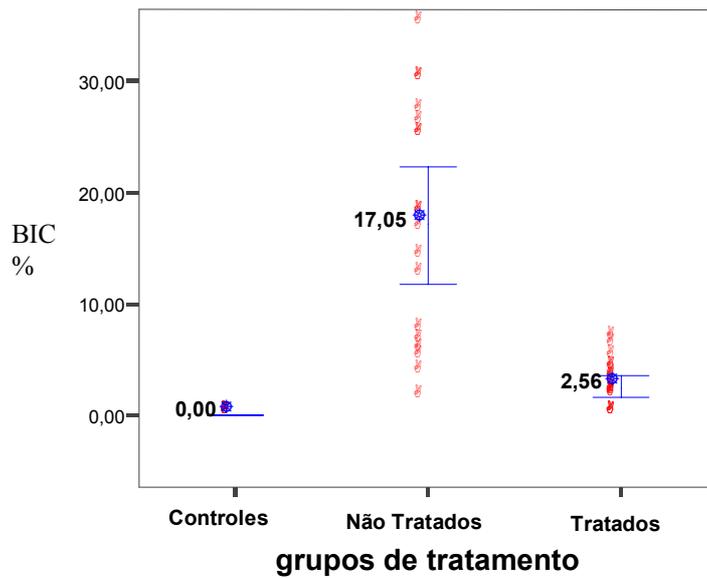
Pneumonia por *Pseudomonas*: A positividade para a BIC nas amostras do LBA no limiar de 2% foi semelhante, com 9 casos (69,2%) em cada um dos dois subgrupos, mostrando que o tratamento com amicacina não interferia no encontro de BIC, da mesma forma como visto nas culturas quantitativas. Os valores médios e desvios padrão da BIC não tiveram diferença estatística, sendo de  $5,59\% \pm 3,4$  no P1 (tratado) e de  $3,80\% \pm 6,0$  no P2 (não-tratado) (Gráfico 5). Esses valores, entretanto, são inferiores comparativamente aos encontrados no subgrupo não-tratado com pneumonia pneumocócica. A presença de BEC foi vista em 5 casos (38,5%) do P1 e em 2 casos (23,1%) do P2, sendo que a sua presença ocorreu em 5 casos com BIC acima de 5% e em 2 casos com valores inferiores. A acurácia geral, considerando todos casos com pneumonia por *Pseudomonas*, ficou em 77% (S=69%; E=100%; VPP=100%; VPN=55%) (Tabelas 4 e 5).

Não houve positividade para BIC e BEC nos casos controles e a qualidade das amostras para citologia foi assegurada pelo número de células escamosas abaixo de 1%.

A capacidade de predição da BIC para a presença de pneumonia (medida pelo percentual de consolidação) foi calculada por regressão linear cuja equação para a estimativa de pneumonia pneumocócica era:  $\text{Pneumonia (consol.)} = 40,238 + 1,286 \times \text{BIC (neutro 2\%)}$ ; e havia uma correlação entre o valor da BIC e a extensão da pneumonia com  $r = 0,461$ ,  $p < 0,001$ . Para a pneumonia por *Pseudomonas* a equação ficou em:  $\text{Pneumonia (consol.)} = 19,281 + 2,812 \times \text{BIC (neutro 2\%)}$  e uma correlação com  $r = 0,457$ ,  $p < 0,005$ .

Nos dois modelos de pneumonia, a presença de BIC positiva nos animais tratados e nos não-tratados possuía uma sensibilidade de 96% para antever uma cultura quantitativa positiva de valor igual ou superior a  $10^2$  ufc/ml, cujo resultado era obtido três dias após a BIC. Entretanto, o valor preditivo positivo da BIC de 2% para culturas positivas diminuía de 100% nos animais não-tratados para 58%, considerando todos os casos (tratados e não-tratados); 96% dos casos com BIC negativa tinham cultura negativa (valor preditivo negativo alto). Todos os 30 casos, exceto 1 (caso A3.10 do grupo tratado), com culturas quantitativas iguais ou superiores a  $10^2$  ufc/ml, possuíam BIC positiva, e culturas com valores acima de  $10^4$  ufc/ml tinham sempre BIC acima de 5%.

**Gráfico 4. Comparação dos valores de Bic (%) em animais tratados para pneumonia por pneumococco**



**Gráfico 5 - Comparação dos valores de BIC (%) em animais tratados para pneumonia por Pseudomonas**

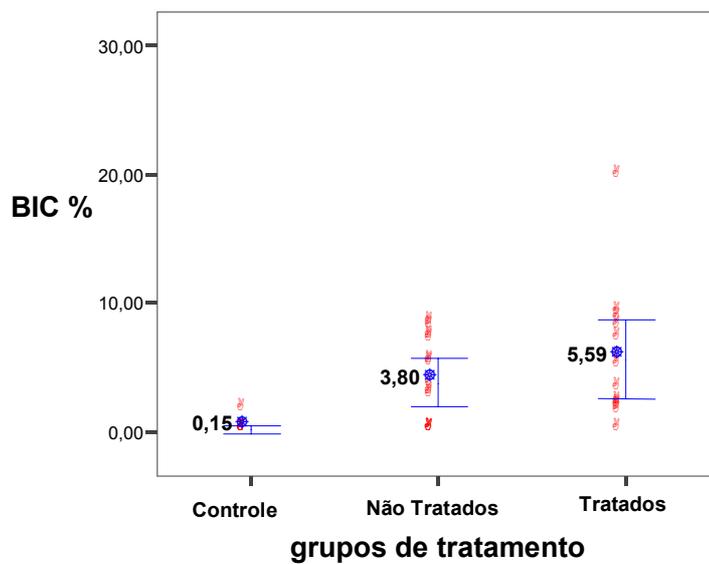


TABELA 4 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos da BIC 2% em macrófagos

Variável*	Pneumococco		Pseudomonas	
	Não-Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não-Tratados N = 13	Tratados n = 13
Sensibilidade ( IC 95%)**	94,4 (70,6 – 99,7)	57,9 (34,0 – 78,9)	69,2 (38,9 – 89,6)	69,2 (38,9 – 89,6)
Especificidade (IC 95%)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)
Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (68,0 – 100,0)	100,0 (62,9 – 100,0)	100,0 (62,9 – 100,0)
Valor Preditivo Negativo (IC 95%)	100,0 (77,1 – 100,0)	55,5 (31,3 – 77,6)	71,4 (42,0 – 90,5)	71,4 (42,0 – 90,5)

\* Resultados para cada grupo comparado ao grupo controle; \*\* Intervalo de confiança de 95%.

TABELA 5 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para BIC 2% em neutrófilos

Variável*	Pneumococco		Pseudomonas	
	Não-Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não-Tratados N = 13	Tratados n = 13
Sensibilidade ( IC 95%)**	100,0 (78,0 – 100,0)	42,1 (21,1 – 66,0)	53,8 (26,7 – 79,6)	76,9 (45,0 – 93,8)
Especificidade (IC 95%)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)
Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	100,0 (78,0 – 100,0)	100,0 (59,8 – 100,0)	100,0 (56,1 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)
Valor Preditivo Negativo (IC 95%)	100,0 (65,0 – 100,0)	47,6 (26,4 – 69,7)	62,5 (35,9 – 83,7)	79,9 (45,9 – 93,8)

\* Resultados para cada grupo comparado ao grupo controle; \*\* Intervalo de confiança de 95%.

### 4.3.2 Medida de Concordância na Leitura da Bactéria Intracelular

A comparação da leitura sobre a presença de BIC e BEC nas amostras de LBA, feita por dois métodos diferentes (aberto e padronizado) com leitores independentes, mostrou boa concordância entre ambos, medida pelo teste *kappa* tanto em neutrófilos quanto em macrófagos nos três grupos de animais. O valor do teste *kappa* foi de 0,698 para a leitura em neutrófilos ( $p < 0,0001$ ) e de 0,708 em macrófagos ( $p < 0,0001$ ) nos casos de pneumonia pneumocócica; de 0,651 em neutrófilos ( $p < 0,0001$ ) e de 0,503 em macrófagos ( $p < 0,0001$ ) nos casos de pneumonia por *Pseudomonas*.

O método aberto, não-gráfico, tem maior sensibilidade de reconhecimento da BIC na presença de pneumonia, comparado ao método gráfico, considerando todos os grupos juntos (78,3% no método aberto vs 54,8% no método gráfico), mantendo igual especificidade (100%).

A pesquisa de BIC comparando neutrófilos e macrófagos não mostrou diferenças de resultados, teste *kappa* de 0,732  $p < 0,0001$ . Embora a BIC seja mais facilmente visualizada nos macrófagos pela coloração de Giemsa, neles a eventual presença de corpúsculos citoplasmáticos pode ser confundida com restos de bactérias fagocitadas, ao contrário dos neutrófilos, que não apresentam esses artefatos. Havendo dúvida, a confirmação da presença de bactéria deve ser feita na coloração de Gram, onde as características morfotintórias das bactérias são melhor ressaltadas. A visualização das bactérias fagocitadas pela coloração de Gram é mais fácil para os cocos Gram-positivos do que para os bacilos Gram-negativos, de coloração mais esmaecida (Figuras 22 e 23).

### 4.3.3 Celularidade do Lavado Broncoalveolar

Em ratos normais, os macrófagos representam 80% das células recuperadas pelo LBA. Na presença de pneumonia, o exame diferencial da celularidade do LBA mostrou uma inversão da distribuição das células inflamatórias, com aumento do número de neutrófilos (média e desvio padrão de  $59,0 \pm 15,8$  no grupo não-tratado, de  $53,8 \pm 17,3$  no grupo tratado e de  $31,2 \pm 11,2$  nos controles), ao mesmo tempo em que havia redução do percentual de macrófagos (média e desvio padrão de  $38,6 \pm 16,4$  e  $42,4 \pm 17,2$ ,

respectivamente, nos grupos não-tratados e tratados, contra  $62,9 \pm 11,8$  do grupo controle). A diferença é significativa ( $p < 0,001$ ) somente na comparação de pneumonia com os animais controles. O percentual de linfócitos não sofreu diferenças significativas entre os grupos (Tabela 6). Avaliando a presença de neutrofilia igual ou superior a 50% como fator discriminador de diagnóstico para pneumonia, foram encontrados:  $S=77,8\%$ ;  $E=100\%$ ;  $VPP=100\%$ ;  $VPN=71,4\%$  para pneumonia pneumocócica e  $S=69,2\%$ ;  $E=100\%$ ;  $VPP=100\%$ ;  $VPN=71,4\%$  para *Pseudomonas* (Tabela 7). Embora a neutrofilia ateste a presença do processo inflamatório, ela não é considerada específica de infecção, podendo ocorrer também em processos pulmonares inflamatórios não infecciosos. Por outro lado, o encontro no LBA de um número normal de neutrófilos possui um alto valor preditivo negativo para a ausência de pneumonia.

TABELA 6 – Celularidade do lavado broncoalveolar entre os vários grupos de estudo, comparando as médias e desvios-padrão dos percentuais de macrófagos, neutrófilos e linfócitos

Variável*	Pneumococco		Pseudomonas		Controles n = 10	P
	Não-Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não-Tratados N = 13	Tratados n = 13		
Macrófagos (%)	$38,4 \pm 16,4^{**}$	$42,1 \pm 20,1^{**}$	$38,9 \pm 17,8^{**}$	$42,7 \pm 14,3^{**}$	$62,9 \pm 11,8$	0,002
Neutrófilos (%)	$60,4 \pm 19,7^{**}$	$54,1 \pm 19,1$	$57,6 \pm 17,7$	$53,6 \pm 15,5$	$31,2 \pm 11,2$	0,0001
Linfócitos (%)	$3,7 \pm 3,4^{**}$	$4,3 \pm 4,7^{**}$	$11,2 \pm 20,69$	$6,1 \pm 6,0$	$5,3 \pm 5,6$	-

\* Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão; \*\* comparações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle (testes: ANOVA/Bonferroni).

TABELA 7 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para neutrófilos (50%) nos grupos de estudo

Variável*	Pneumococco		Pseudomonas	
	Não-Tratados n = 18	Tratados n = 19	Não-Tratados n = 13	Tratados n = 13
Sensibilidade (IC 95%)**	77,8 (51,9 – 92,6)	64,7 (38,6 – 84,7)	69,2 (39,0 – 89,6)	61,5 (32,3 – 84,9)
Especificidade (IC 95%)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)	100,0 (65,5 – 100,0)
Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	100,0 (73,2 – 100,0)	100,0 (67,8 – 100,0)	100,0 (62,9 – 100,0)	100,0 (59,8 – 100,0)
Valor Preditivo Negativo (IC 95%)	71,4 (42,0 – 90,4)	62,5 (35,9 – 83,7)	71,4 (42,0 – 90,0)	66,7 (38,7 – 87,0)

\* Resultados para cada grupo comparado ao grupo controle; \*\* Intervalo de confiança de 95%.

Considerando todos os casos de pneumonia, tratados e não-tratados, causada tanto por pneumococo quanto por *Pseudomonas*, examinados pelo LBA, pode-se construir uma tabela geral do rendimento da BIC no limiar de 2% e das culturas quantitativas com  $10^2$  ufc/ml (Tabela 8). Os dados mostram para a BIC 76% de resultados verdadeiro-positivos, 100% de verdadeiro-negativos, nenhum falso-positivo e um número baixo (23%) de falso-negativos, gerando uma acurácia geral de 66%. Por outro lado, os resultados das culturas quantitativas indicam uma acurácia geral de 53% onde o número de testes verdadeiro positivos é de 46%, mantendo 100% de verdadeiro-negativos, ausência de falso-positivos e 55.5% de falso-negativos, demonstrando uma leve vantagem da pesquisa da BIC sobre as culturas para o diagnóstico de pneumonia.

Fica, pois, demonstrado que os exames direto e cultural do LBA feitos na vigência de antibioticoterapia efetiva para o agente etiológico da pneumonia (exemplo do modelo com pneumonia pneumocócica) têm um rendimento diagnóstico reduzido e devem ser desaconselhados. Entretanto, quando na presença de antibióticos inefetivos (exemplo do modelo com pneumonia por *Pseudomonas*, ou em casos que desenvolvem pneumonia na vigência de antibióticos), o rendimento do LBA não é alterado pelos antibióticos. O conjunto de testes obtidos por LBA exibe um comportamento semelhante e sinérgico nas várias situações de pneumonia, sendo que a BIC possui uma sensibilidade superior (sensibilidade geral de 76%) em relação às culturas quantitativas (sensibilidade de 46%) para a detecção da mesma e sempre deve ser utilizada para o diagnóstico. A especificidade dos vários testes, sempre elevada pelas características deste trabalho experimental, costuma ter valores menores para as culturas quantitativas, mas se mantém elevada para a pesquisa de BIC. Desta forma, estes resultados também sustentam a recomendação de que a indicação do LBA para o diagnóstico de pneumonias nosocomiais deve sempre ser feita na ausência ou interrupção dos antibióticos, ou no contexto clínico quando houver má resposta aos mesmos.

TABELA 8 – Dados sumarizados do rendimento diagnóstico da BIC a 2% e culturas quantitativas (no limiar de  $10^2$  ufc/ml)

	N	Verdadeiro-Positivos	Verdadeiro-Negativos	Falso-Positivos	Falso-Negativos
<b>BIC 2%</b>					
Pneumococco					
Não-Tratados	18	18	0	0	0
Tratados	19	11	0	0	8
<i>Pseudomonas</i>					
Não-Tratados	13	9	0	0	4
Tratados	13	10	0	0	3
Controles	10	0	10	0	0
Todos					
Não-Tratados	41	27/31 (87%)	10	0/10	4/31 (13%)
Tratados	42	21/32 (66%)	10	0/10	11/32 (34%)
Total Geral	73	48/63 (76%)	10/10 (100%)	0/10	15/63 (24%)
<b>MICRO <math>10^2</math></b>					
Pneumococco					
Não-Tratados	18	15	0	0	3
Tratados	19	4	0	0	15
<i>Pseudomonas</i>					
Não-Tratados	13	5	0	0	8
Tratados	13	5	0	0	9
Controles	10	0	10	0	0
Todos					
Não-Tratados	41	20/31 (64%)	10	0/10	11/31 (35%)
Tratados	42	9/32 (28%)	10	0/10	24/32 (75%)
Total Geral	73	29/63 (46%)	10/10 (100%)	0/10	35/63 (55%)

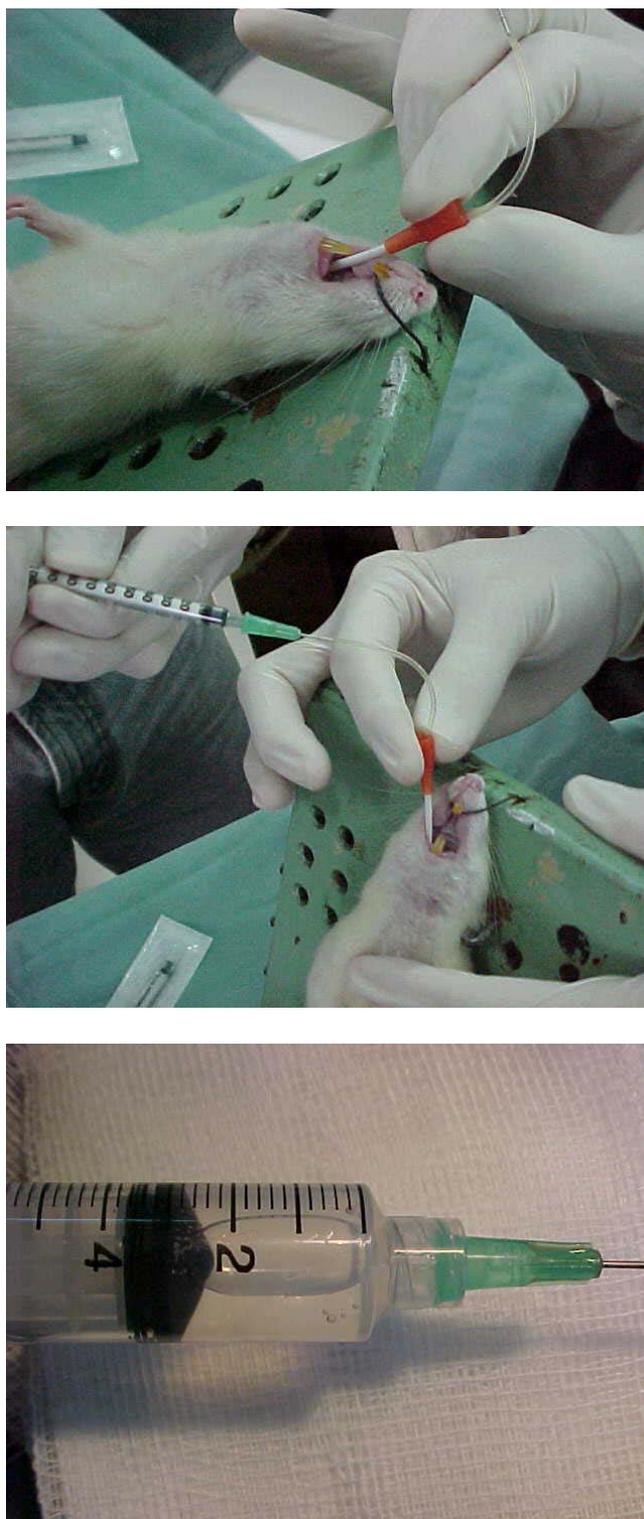


FIGURA 1 Técnica do lavado broncoalveolar com duplo cateter sob anestesia

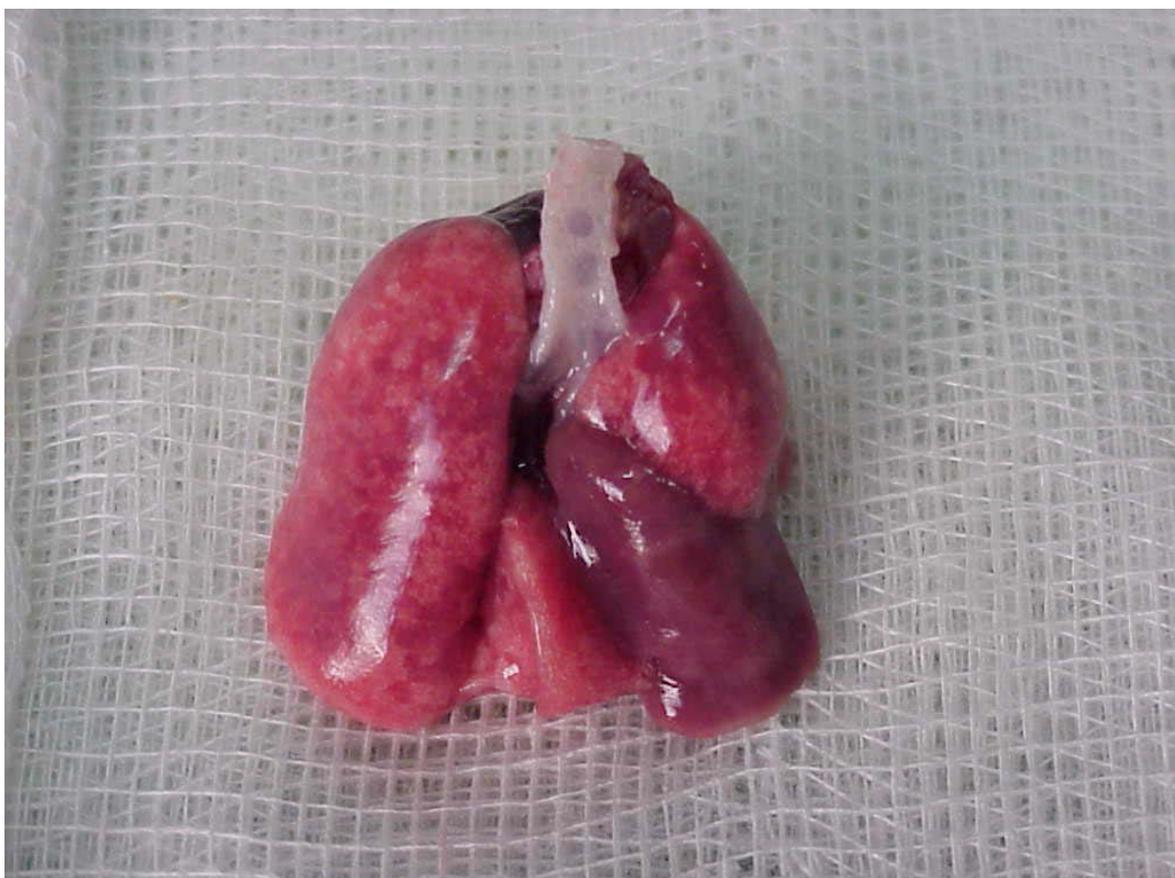


FIGURA 2 Bloco dos pulmões e traquéia, mostrando consolidação do lobo inferior direito (visão posterior).

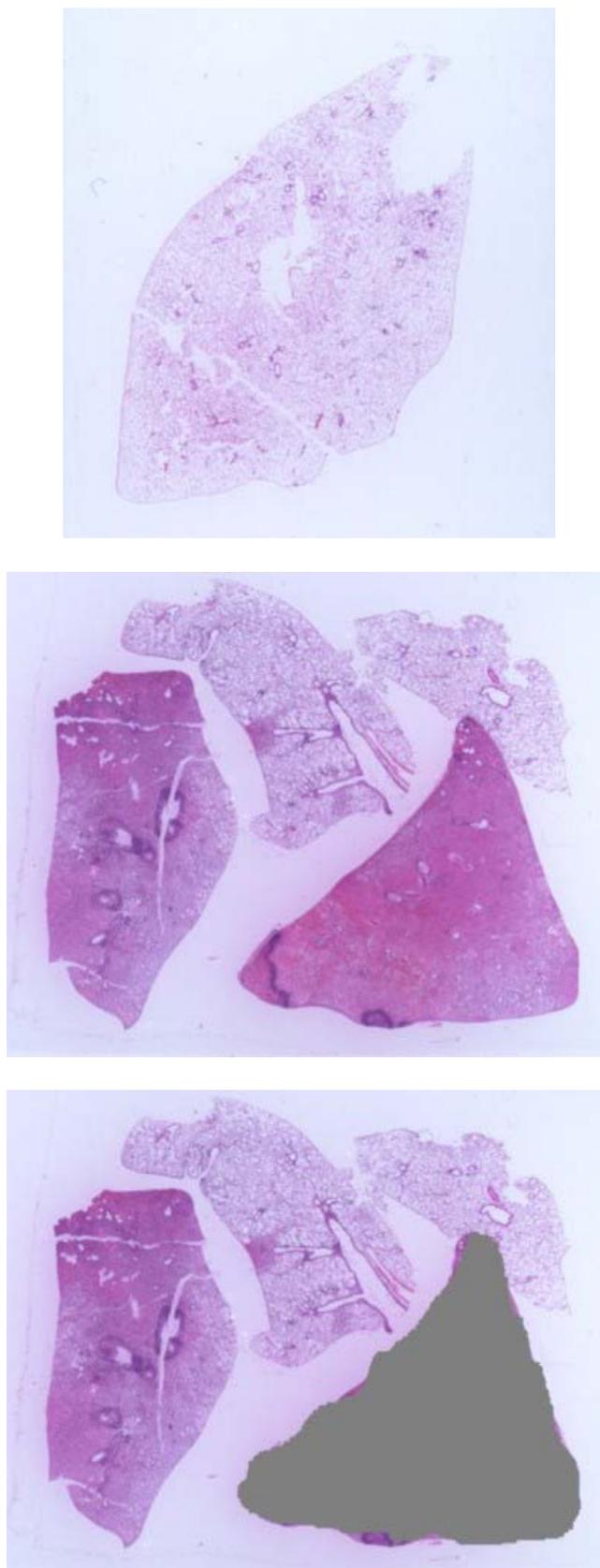


FIGURA 3 Técnica de morfometria para delimitação da área consolidada em cortes sagitais de pulmões corados por HE

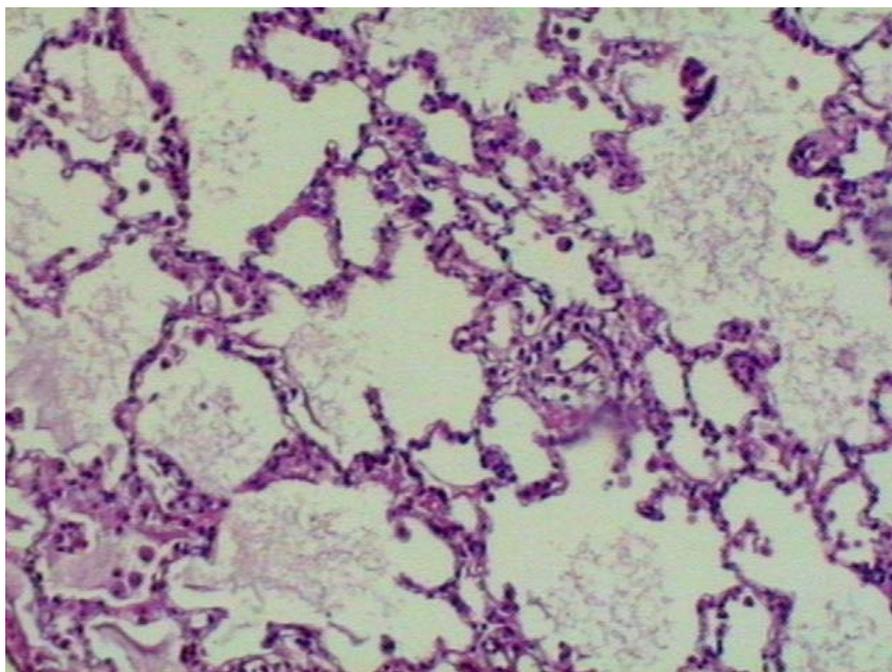


FIGURA 4 Pulmão normal, coloração pela HE

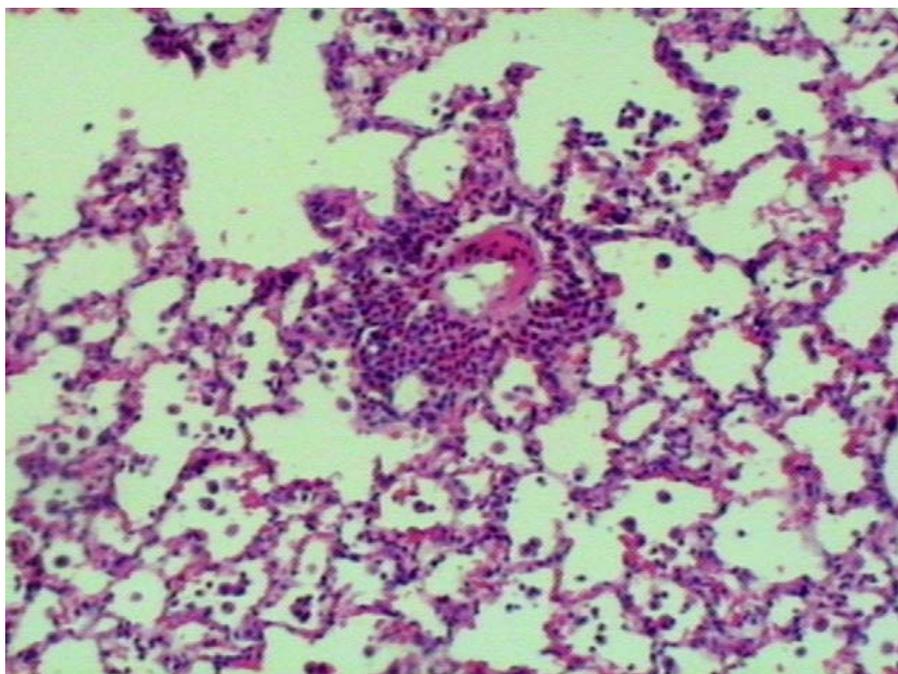


FIGURA 5 Pneumonia pneumocócica em fase inicial, neutrófilos ao redor de vasos e capilares congestionados

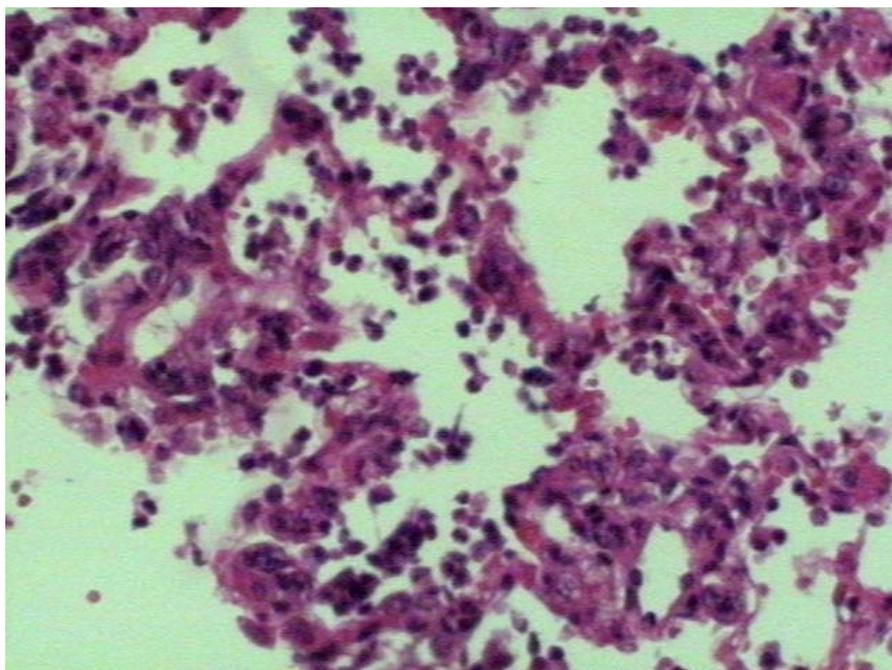


FIGURA 6 Pneumonia pneumocócica em fase inicial, com edema, neutrófilos perivasculares e capilares congestionados – HE

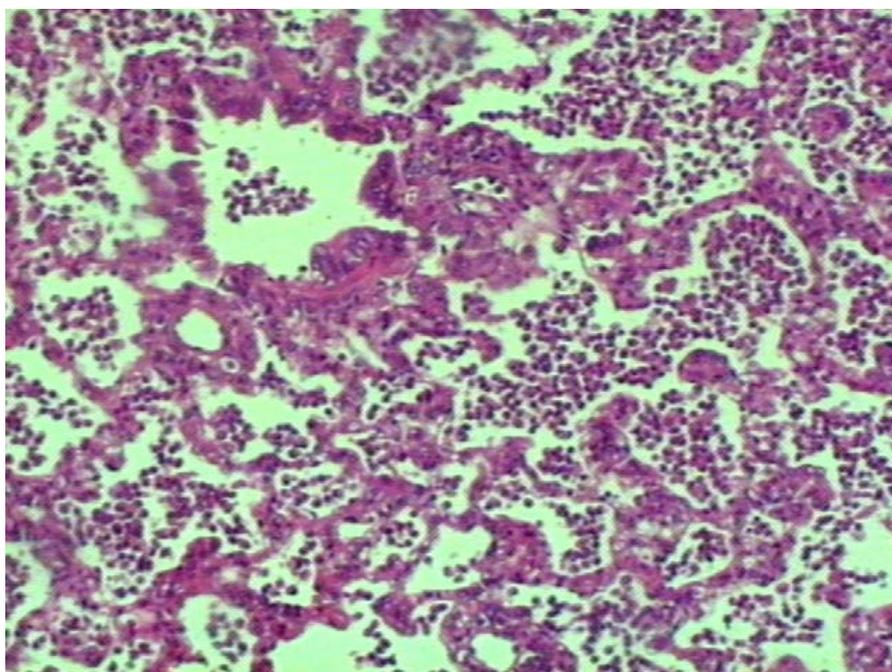


FIGURA 7 Pneumonia lobar pneumocócica, alvéolos com neutrófilos e capilares congestionados, fase de hepatização vermelha – HE

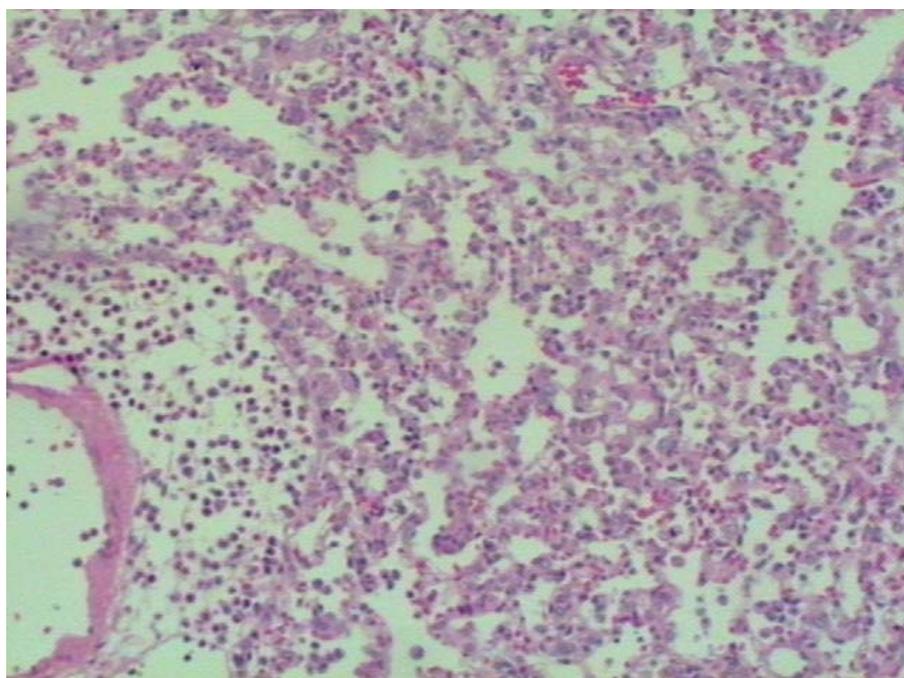


FIGURA 8 Pneumonia lobar pneumocócica em fase intermediária (Fase 2) – HE

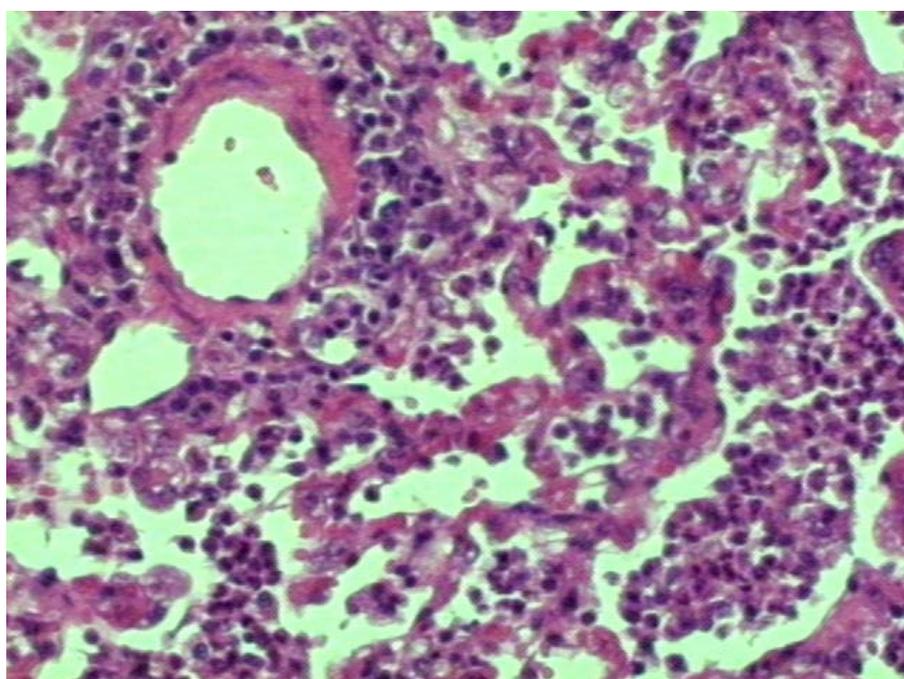


FIGURA 9 Pneumonia lobar pneumocócica em fase inicial, neutrófilos dentro de alvéolos e congestão capilar – HE

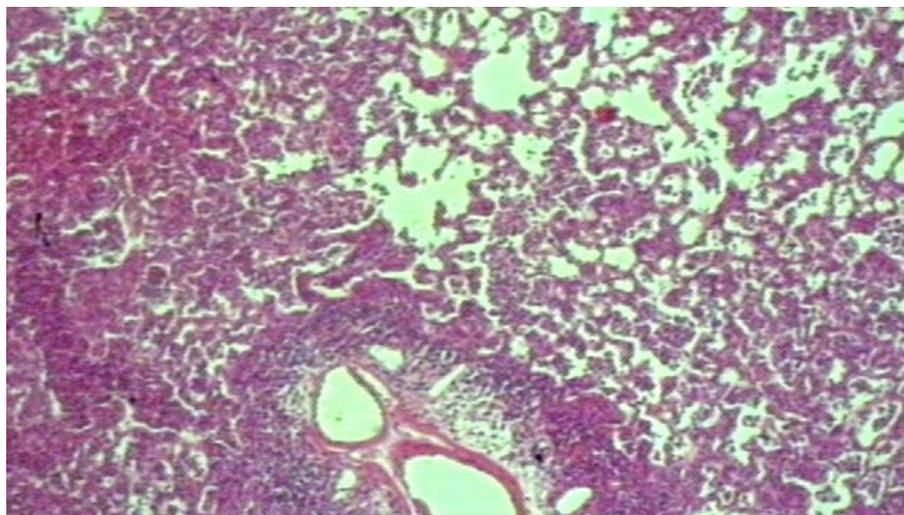


FIGURA 10 Pneumonia pneumocócica com focos confluentes (Fase 3) – HE

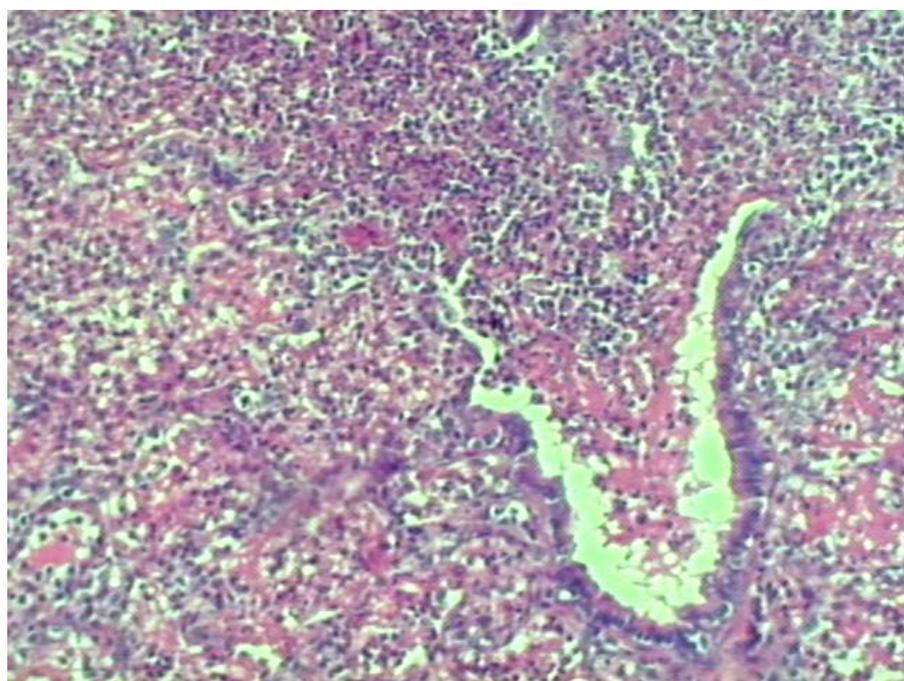


FIGURA 11 Pneumonia pneumocócica mostrando bronquíolo respiratório repleto de neutrófilos – HE

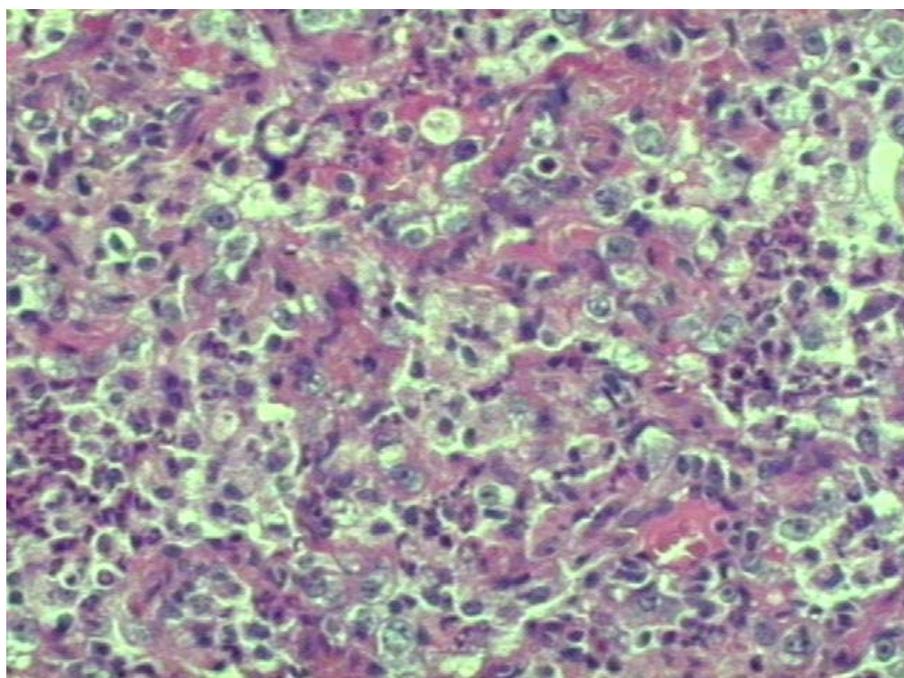


FIGURA 12 Pneumonia lobar pneumocócica, início da organização, com macrófagos alveolares em adição aos neutrófilos – HE

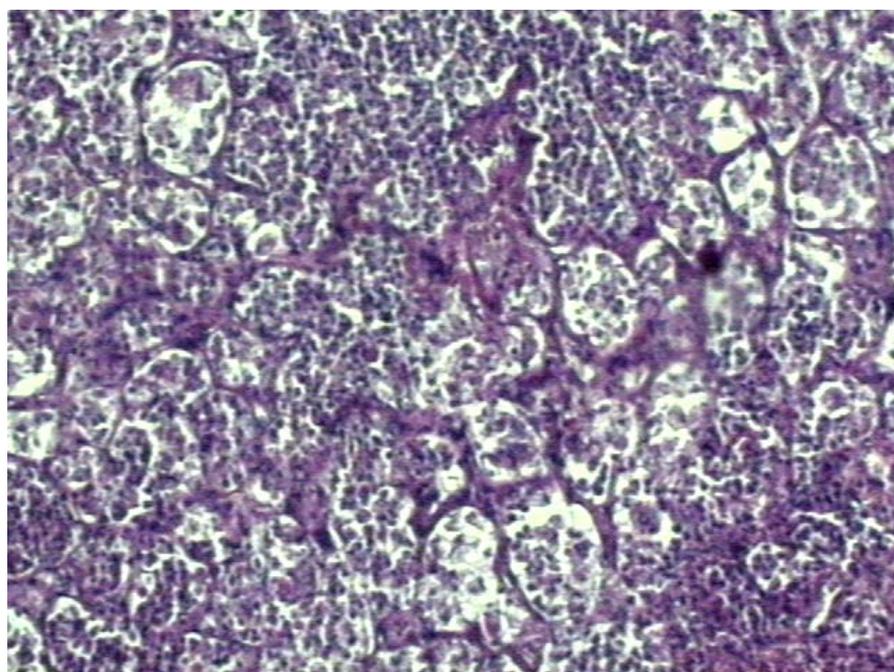


FIGURA 13 Pneumonia lobar pneumocócica – foco de hepatização cinzenta, alvéolos repletos de neutrófilos e hemácias – HE

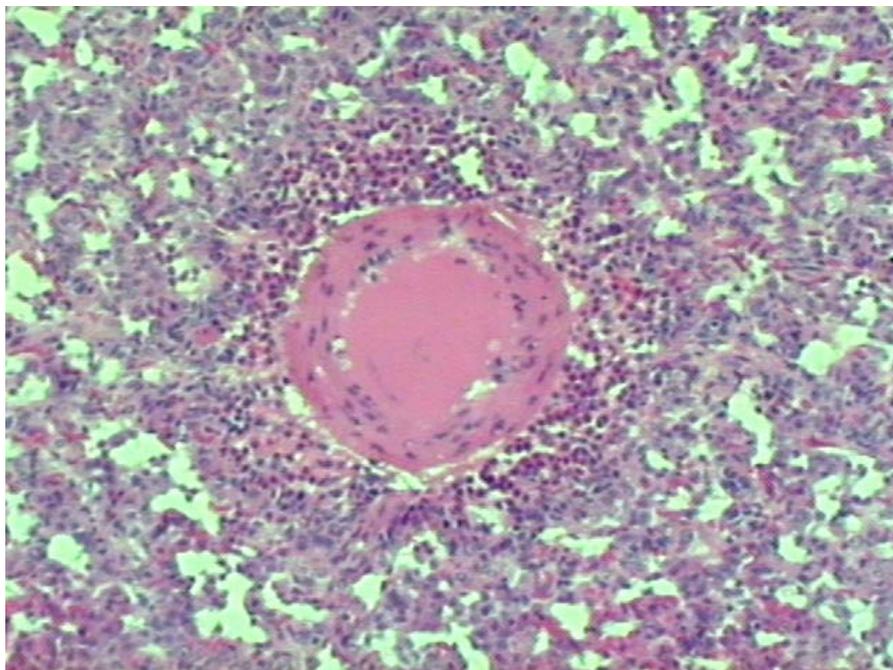


FIGURA 14 Pneumonia por *Pseudomonas* – vaso com infiltrado inflamatório – HE

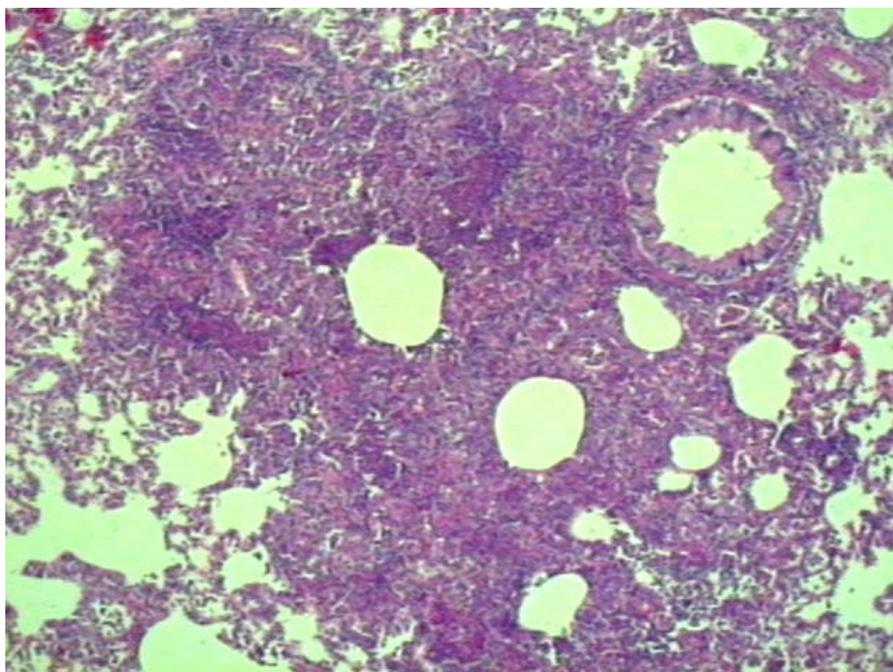


FIGURA 15 Broncopneumonia focal por *Pseudomonas* – em fase inicial – HE

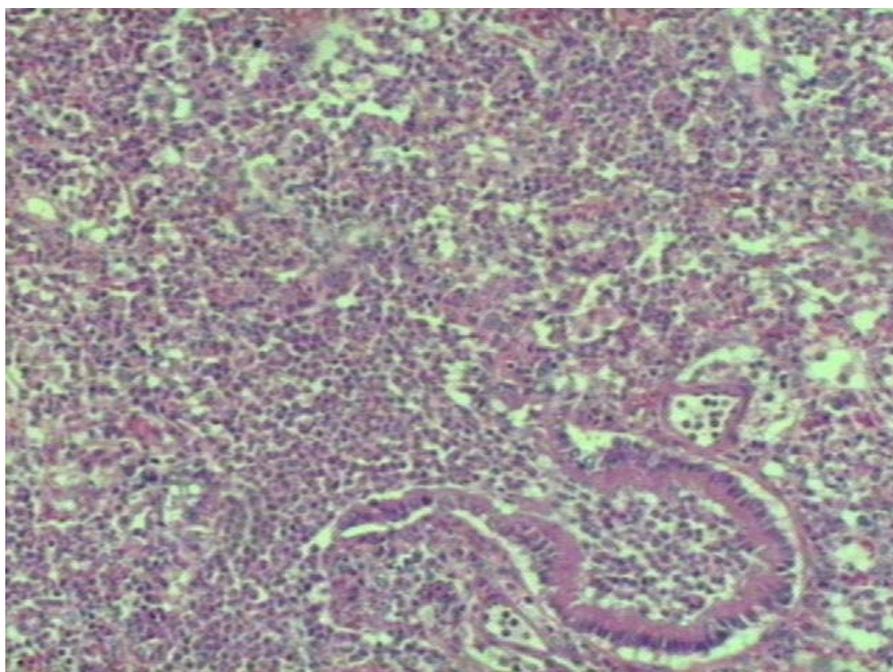


FIGURA 16 Pneumonia por *Pseudomonas*, com bronquíolo e alvéolos repletos de neutrófilos – HE

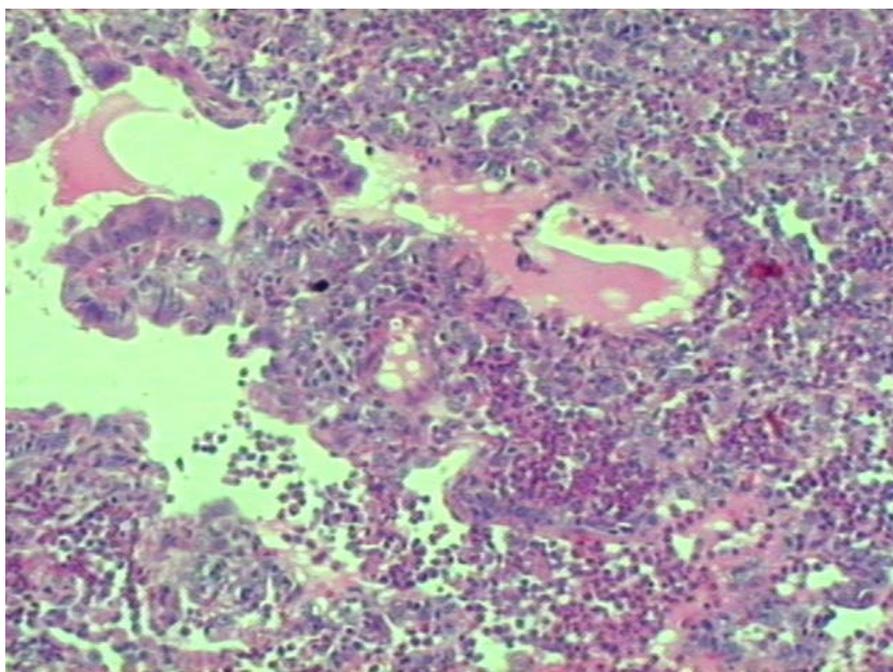


FIGURA 17 Pneumonia por *Pseudomonas* mostrando foco broncopneumônico com hemorragia – HE

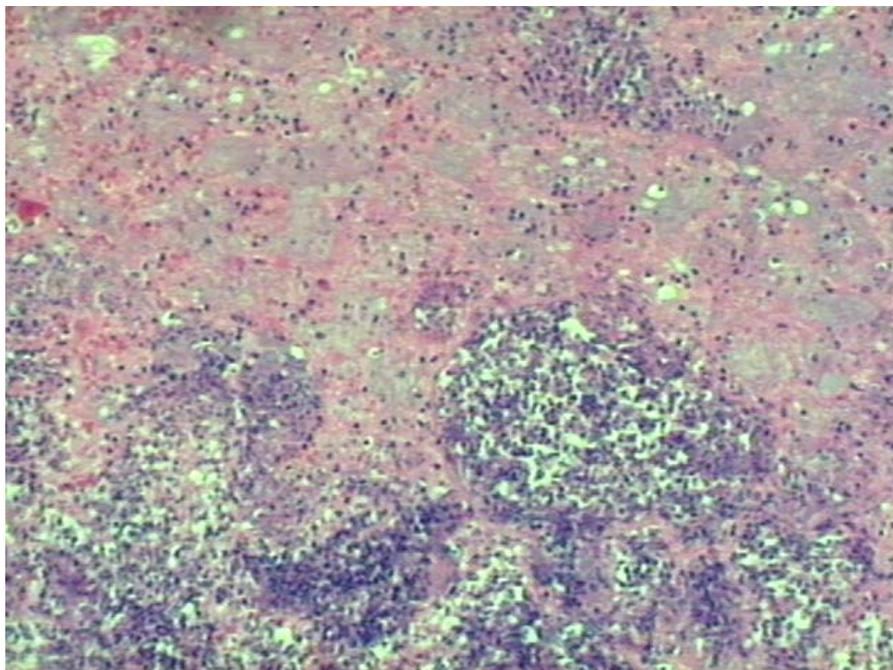


FIGURA 18 Pneumonia por *Pseudomonas* com foco de necrose e exsudato fibrinoso em Fase 3 – HE

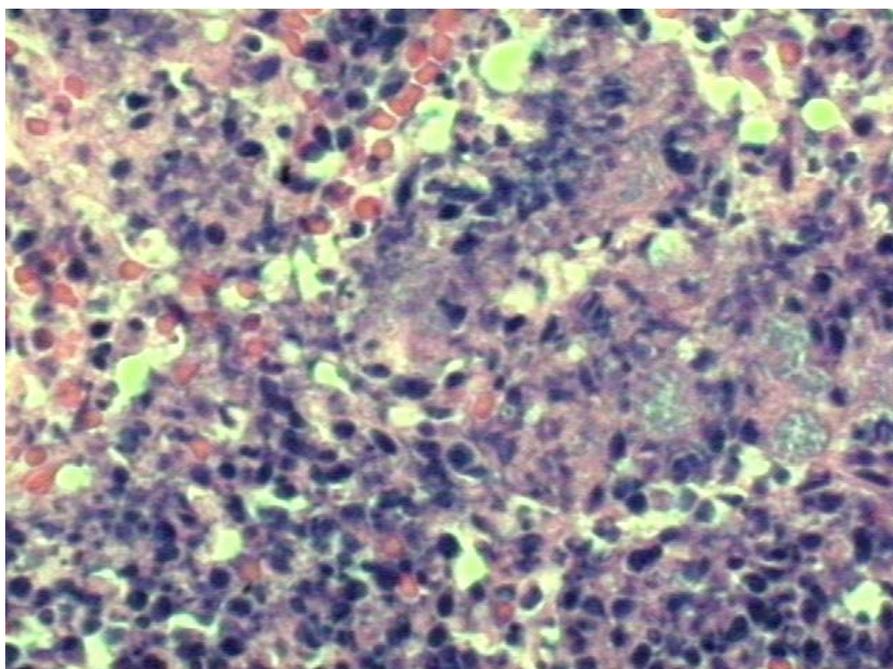


FIGURA 19 Pneumonia por *Pseudomonas* com focos de necrose, hemorragia e bactérias – HE.

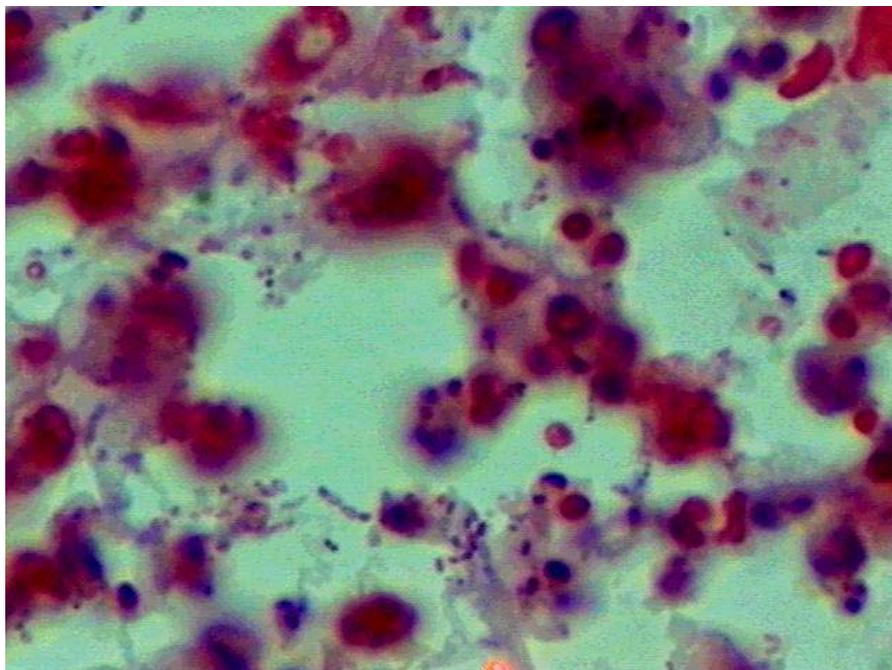


FIGURA 20 Pneumonia pneumocócica – coloração de Gram no tecido pulmonar mostrando *S. pneumoniae* nas áreas consolidadas e periféricas

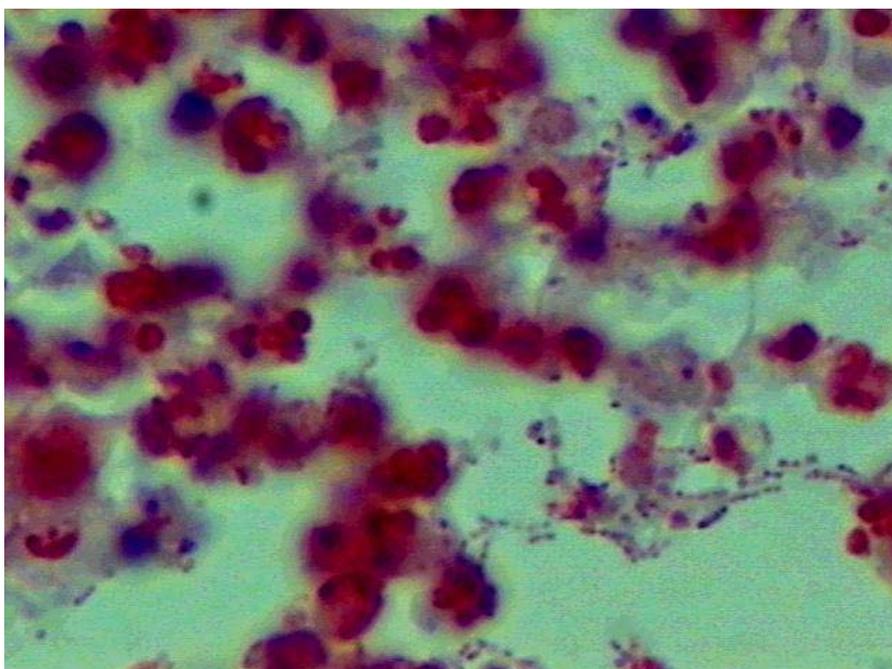


FIGURA 21 Pneumonia pneumocócica, coloração de Gram para tecido pulmonar mostrando a presença de alta densidade de *S. pneumoniae* no parênquima pulmonar.

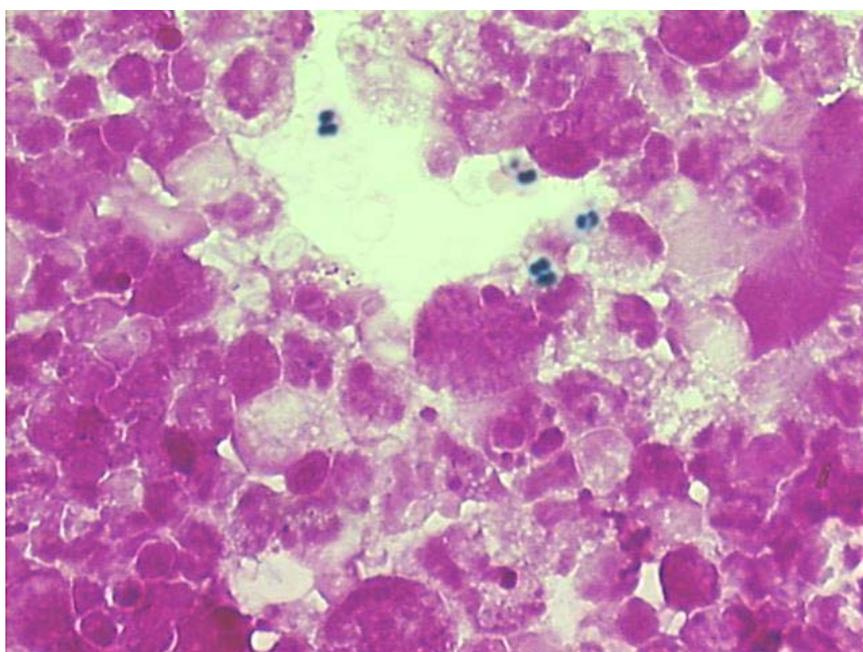
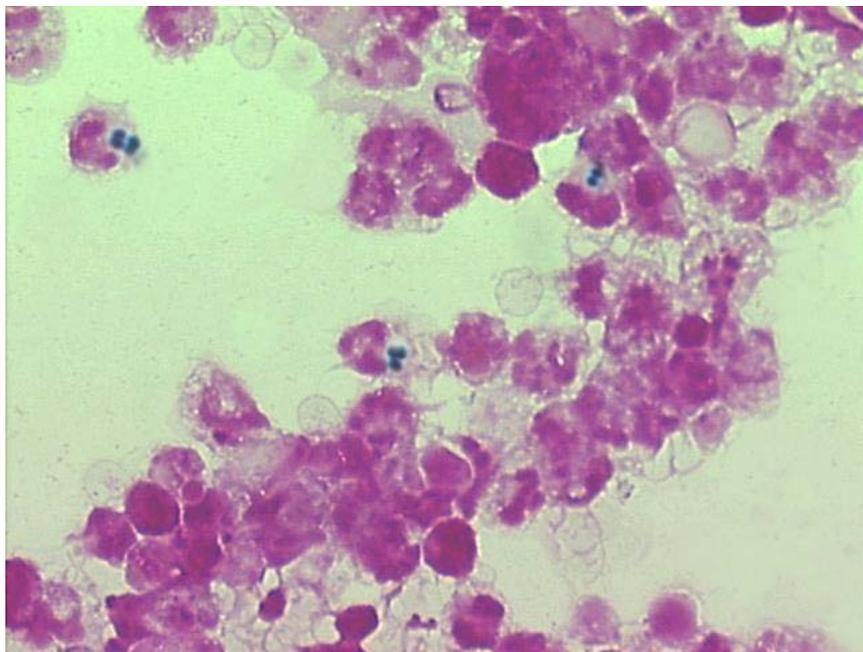


FIGURA 22 Exame direto do LBA, coloração de Gram mostrando *S.pneumoniae* no interior de neutrófilos e também extracelular (grande aumento e imersão em óleo)

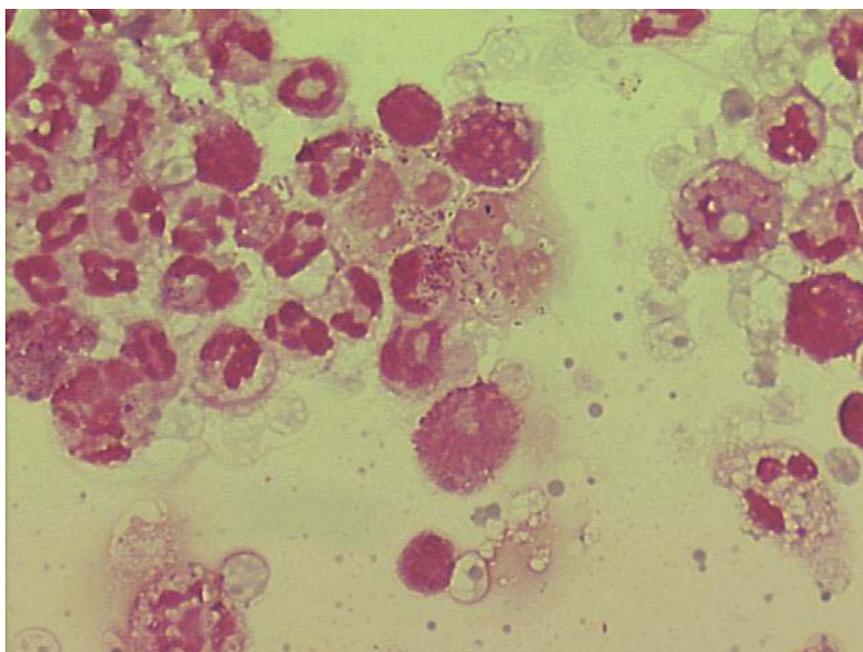
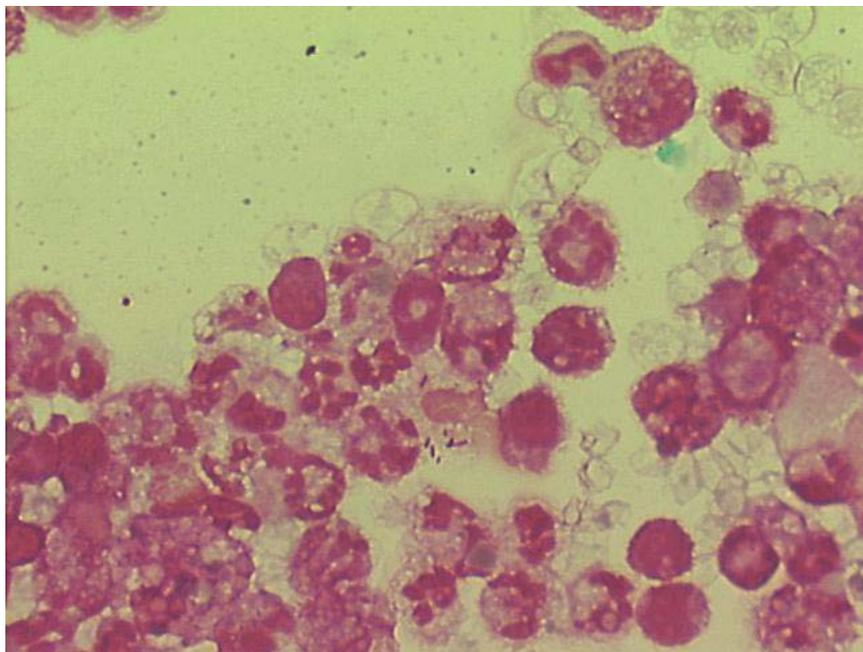


FIGURA 23 Exame direto do LBA, coloração de Gram mostrando *P. aeruginosa* em neutrófilos e macrófagos (grande aumento, imersão em óleo)

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

O diagnóstico correto da pneumonia nosocomial permanece ainda como uma tarefa difícil para o médico pela ausência de padronização definitiva. No entanto, sabe-se que a facilidade e a precocidade do diagnóstico são essenciais para determinar o manejo correto dos pacientes e o sucesso do tratamento. Por outro lado, a acuidade diagnóstica tem interesse epidemiológico na medida em que facilita o conhecimento das taxas reais de incidência e dos desfechos relacionados desta doença de alta morbi-mortalidade. No caso da PAVM, a determinação do diagnóstico de “pneumonia verdadeira” é uma possibilidade muito rara de ser obtida na prática clínica. O elemento que permite o diagnóstico é o exame histopatológico, pela demonstração da presença de infiltração neutrofílica em bronquíolos terminais e alvéolos, onde a intensidade da lesão e a extensão do processo estabelecem a severidade da doença. Diferentemente da pneumonia comunitária por agente primário, na nosocomial o tipo de agente etiológico é menos determinante da patogenicidade, pois tanto cocos Gram-positivos quanto os bacilos Gram-negativos causam, em geral, graus similares de lesão pneumônica e mortalidade. Assim também cavitação pulmonar ou hemoculturas positivas igualmente relacionadas ao diagnóstico comprobatório são encontradas em uma minoria de casos. A quase impraticabilidade do diagnóstico comprobatório leva o médico a usar seu bom senso clínico e a aplicar testes substitutos que o auxiliem no esclarecimento da causa de febres associadas a infiltrados pulmonares, já que estes sinais e sintomas costumeiramente são inespecíficos em se tratando de pacientes criticamente doentes. Entre os testes disponíveis broncoscópicos e não-broncoscópicos ou mesmo os simples aspirados traqueais, todos com limitações de acurácia, o imenso volume de publicações e discussões dedicadas ao tema não trouxe soluções definitivas para o contínuo dilema do médico frente ao paciente grave com suspeita de pneumonia nosocomial.

Por considerar-se que o LBA é, dentre os testes disponíveis, aquele que fornece maior número de informações, no presente trabalho decidiu-se estudar mais profundamente seu rendimento para o diagnóstico em um modelo experimental em animais. Concentrou-se o foco de maior interesse nos resultados do exame direto precoce, para o qual as pesquisas clínicas fornecem resultados ainda contraditórios e também pelo fato de que dados similares são mais difíceis de ser obtidos em estudos de pneumonia em humanos. Somente 4 trabalhos analisaram sistematicamente o rendimento do exame direto tendo como padrão referencial a histopatologia que foi obtida de amostras *post-mortem*<sup>49,51,62,109</sup>.

É importante salientar que neste trabalho, originado nas controvérsias existentes sobre a capacidade diagnóstica do LBA nos casos de pneumonia nosocomial e principalmente na PAVM, a primeira questão refere-se à aplicação dos seus resultados baseados em um modelo experimental com animais não ventilados mecanicamente. Neste aspecto, é pertinente considerar que os resultados não podem ser integralmente transpostos para casos de PAVM, sem levar em conta suas diferenças fisiopatológicas, bem mais complexas e irregulares em relação aos demais tipos de pneumonias. Tendo esta limitação em mente, o presente modelo de pneumonia procurou avaliar o rendimento básico do uso do LBA, seja ele broncoscópico ou não, no modelo de pneumonia que possuísse em todas as fases um teste-padrão referencial (histopatologia). A aplicação do estudo usando modelos de animais ventilados vem sendo programada para a próxima fase da experimentação, já que é necessário adquirir maior controle no uso de VM em animais de laboratório. Existe uma grande dificuldade em manter animais pequenos (roedores) em VM por períodos prolongados, sendo este um modelo extremamente trabalhoso e com grande perda de animais (em torno de 60%), devido ao difícil manejo da instabilidade hemodinâmica e homeostática. O uso de animais maiores, como cães ou porcos, necessita de uma estrutura laboratorial mais sofisticada, mantendo uma UTI com plantão, anestesia e monitoração hemodinâmica contínuas, além de ser muito dispendioso. Esses modelos, ao que se sabe, foram usados somente por Johanson<sup>22</sup>, usando babuínos, e por Marquette e colaboradores<sup>46</sup>, com porcos, e são considerados ideais para estudar a PAVM. Nesses modelos foi demonstrado que a pneumonia passa a ser uma decorrência natural da manutenção da VM em 48h a 72h, não necessitando inoculação adicional de bactérias.

A proposta básica do presente estudo foi a de avaliar o uso do LBA em dois modelos de pneumonia, um causado por Gram-negativos e o outro por Gram-positivos, verificando ao mesmo tempo as influências do tratamento com antibióticos nos testes

diagnósticos. Mesmo em pacientes sem VM esta situação é também relevante na prática clínica diária, pois a maioria das solicitações do exame broncoscópico e coletas seletivas ocorre pela dúvida diagnóstica, em pacientes hospitalizados com infiltrados pulmonares não resolvidos ou com má evolução clínica. Na maioria desses casos, o exame é solicitado em um momento em que já foi testado o tratamento antibiótico empírico com mau resultado. Os modelos experimentais aqui utilizados apresentam algumas vantagens na medida em que procuram evitar algumas das dificuldades existentes nos estudos clínicos, quais sejam: a comparação feita no mesmo período temporal entre os resultados do LBA e a histopatologia; a obtenção do LBA com igual volume amostral recolhido entre os grupos de comparação (questão freqüentemente apontada pelos autores como capaz de influenciar os resultados); randomização dos casos; obtenção de amostras com qualidade assegurada com menos de 1% de células escamosas; leituras cegadas entre os examinadores dos resultados da citologia, microbiologia e histologia e o exame histológico do pulmão inteiro.

O modelo de pneumonia escolhido já foi utilizado por outros autores<sup>143,154</sup>, que induziram a pneumonia por inoculação intrabrônquica. Esta forma de indução encontra sua justificativa nos trabalhos de Towes<sup>143</sup>, que afirma: “A instilação endotraqueal em áreas localizadas de animais anestesiados e intubados produz modelos com inóculos mais controlados e mais similares aos humanos e possibilita a manipulação do inóculo, sendo possível obter uma relação equilibrada entre agentes infecciosos e fagócitos potenciais”. Usando seus ensinamentos, observou-se que inóculos com mais de  $10^8$  ufc/ml não são inativados pelos animais, levando à multiplicação bacteriana, e são determinantes da patogenicidade. O tamanho do inóculo influi também no tipo de célula fagocitária, sendo que inóculos de  $10^5$  ufc/ml são rapidamente depurados pelos macrófagos alveolares residentes e quantidades maiores requerem o afluxo de granulócitos para ser efetivos, existindo um nível crítico da proporção bactéria/fagocitose<sup>144</sup>. O mecanismo pelo qual os macrófagos alveolares sentem necessidade de recrutar outros fagócitos não é bem conhecido, havendo influência de outros fatores, tais como: virulência bacteriana, presença de cápsula de mucopolissacarídeos (a mais importante e conhecida), enzimas, toxinas, proteases (que causam lesão de estruturas pulmonares) e o *status* imunológico do hospedeiro. Nesses casos a limpeza mucociliar não atua e as bactérias que atingem o pulmão em aglomerados são mais resistentes à fagocitose do que as que chegam dispersas<sup>143</sup>. Por outro lado, a eficiência dos PMNs na limpeza dos alvéolos é dose dependente e diminui com o aumento da carga bacteriana quando a relação bactéria/PMN

atinge valores superiores a 10:1. Outro fator é a resposta inflamatória alveolar que envolve a geração de quimotaxinas alveolares e recrutamento de PMN, onde atuam elementos tais como: complemento C5 e produtos de degradação do ácido araquidônico como leucotrienos B4 e ácido 5-11 monohidro-eicosatetraenóico e citocinas (IL-8, TNF, IL-1)<sup>169,181</sup>. A quimotaxia depende de interações entre macrófagos alveolares, sinais bacterianos como lipopolissacarídeos, fibroblastos e endotélio, que então resultam em movimentos dos PMNs do vaso para o interstício<sup>142,168,169</sup>.

Ao contrário dos PMNs, os macrófagos têm vida mais longa e seus vacúolos possuem conteúdos com vários estágios com longa digestão e degradação de restos celulares. Eles não dependem das opsoninas para fagocitarem, e sim de uma ação derivada de suas ligações com as imunoglobulinas e complemento, além de gerarem intermediários reativos do nitrogênio, tais como óxido nítrico, também conhecido por suas atividades bactericidas. Os macrófagos são importantes na resistência local contra patógenos intracelulares como o pneumococo. A síntese de ácido nítrico é ativada por interferon-gama e os passos subsequentes facilitados por TNF-alfa, originário do próprio macrófago estimulado<sup>142</sup>. Existem microorganismos intracelulares que necessitam aderir aos receptores existentes na superfície dos macrófagos para infectá-los e alguns podem, inclusive, sobreviver no interior do mesmos e destruí-los. Outros podem inibir opsoninas, ou possuir cápsula (polissacarídeo dos pneumococos, responsável pela sua virulência) com resistência à fagocitose, como, por exemplo a proteína M dos *Streptococcus*, e crescem via extracelular. Para haver fagocitose é necessário que as bactérias estejam recobertas com anticorpos específicos e depósitos de C3b – e é possível que este fato seja mais verdadeiro em meios fluidos (plasma) –, mas não seriam necessários na superfície lisa e plana como nos alvéolos. Os microorganismos são considerados mortos após fagocitose se forem incapazes de se multiplicar. Alguns germes, como o *Streptococcus* do grupo A, são rapidamente mortos logo após fagocitados, mas o complexo peptidoglican-polissacarídeo da parede celular resiste à digestão e seus componentes são ainda visíveis nos fagócitos um mês após o término da infecção, pois são difíceis de ser digeridos e seus fragmentos são retidos por períodos mais longos<sup>142</sup>.

O tempo de duração do estudo, limitado a 48h, também foi utilizado no modelo experimental de Piroth<sup>148</sup>, com inoculação endobrônquica em coelhos que produzia pneumonia com alterações histológicas características em 48h e altas concentrações bacterianas que, progressivamente, evoluíram para fibrose em 2 semanas. A comparação

entre o escore patológico e a concentração bacteriana tissular mostrou fraca correlação inversa, em que as concentrações bacterianas altas iniciais diminuía gradativamente até 96h, enquanto paralelamente aumentava o escore histopatológico pelos critérios de Johanson<sup>22,147</sup>. O modelo reproduzia a pneumonia humana e a mortalidade era de 50%. O autor<sup>148</sup> também esperava 4h após a inoculação para iniciar o tratamento e não havia diferenças, como no presente estudo, no escore histopatológico entre os animais tratados e não-tratados com amoxicilina. No modelo experimental de Bergeron<sup>156</sup> todas as fases evolutivas da pneumonia pneumocócica foram estudadas e foi demonstrado que o recrutamento de PMNs iniciava-se nas 4 horas que se seguiam à inoculação, tendo seu ponto alto nas primeiras 24h, quando é maior o crescimento bacteriano nos pulmões. A partir das 24h os PMNs começavam progressivamente a ser substituídos pelos macrófagos, e a concentração dos dois tipos de fagócitos permanecia elevada no LBA mesmo que houvesse diminuição da concentração dos mesmos no sangue e nos tecidos pulmonares. Portanto, o período de 48h de evolução é bastante adequado para obter as amostras de citologia do LBA tanto para neutrófilos quanto para os macrófagos.

As doses de antibióticos empregadas para tratar a pneumonia pneumocócica foram as mesmas propostas por Galvada<sup>154</sup>, que trabalhou também com *S. pneumoniae* provenientes de amostras de infecções em humanos, nas mesmas concentrações de inóculo endotraqueal (10<sup>9</sup> ufc/ml). Esse autor obtinha contagens bacterianas nos pulmões de 10<sup>8</sup> ufc/g em 24h e de 10<sup>9</sup> ufc/g em 72h. O tratamento dos animais com penicilina subcutânea em doses altas (250.000UI/kg) resultava em concentrações séricas de 74,9 microgramas/ml, similares às obtidas em humanos com doses intravenosas de 4.000.000UI de penicilina G, e as doses baixas (100.000UI/kg) ocasionavam concentrações séricas de 17,7 microgramas/ml, similares ao uso em humanos com doses intravenosas de 1.000.000UI. As doses altas eram mais eficazes para diminuir a concentração de bactérias nos pulmões<sup>155</sup>.

O tipo histológico de pneumonia por *S. pneumoniae* em ratos, representando aqui a pneumonia nosocomial de início precoce (6% das pneumonias nosocomiais são causadas por pneumococo), possui um padrão semelhante ao dos humanos, com a presença de consolidações lobares, havendo 5 fases evolutivas nos roedores bem documentadas por Bergeron<sup>156</sup>. Neste sentido, o modelo é mais confiável, por sua reprodutibilidade, do que o de pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa*, cujo padrão evolutivo é mais irregular. As dificuldades de trabalhar com o pneumococo derivam da variação da sua patogenicidade

quando se utilizam amostras congeladas que não são repicadas periodicamente em meio de cultura, podendo perder sua patogenicidade e os animais não desenvolverem infecção. A repicagem semanal mantinha sua atividade patogênica. O fato de o *S. pneumoniae* ser um patógeno extracelular não atrapalhou a condução do experimento visto o seu encontro freqüente no citoplasma quer em neutrófilos quer em macrófagos.

A pneumonia por *Pseudomona aeruginosa*, representando a pneumonia nosocomial por Gram-negativos, possui um padrão de distribuição mais variável e com focos de infecção menos extensos e localizados, cujo componente intersticial é bem marcado, havendo, na maioria dos casos, necrose do parênquima e intensa hiperplasia reacional do epitélio alveolar na fase aguda. Esse padrão de comportamento possivelmente explique a facilidade desse agente em causar lesão pulmonar aguda, tanto que é utilizado em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda infecciosa<sup>150,158,159,160,162,163,164,167,170,172,173,177,176</sup>. A *P. aeruginosa* foi mais difícil de ser recuperada nas culturas quantitativas do LBA, em comparação ao pneumococo, onde crescia em limiares menores do que os estipulados nos estudos. A decisão em utilizá-la derivou do fato de ser patogênica para o rato e representar o agente etiológico mais freqüente da pneumonia nosocomial. Além disso, pretende-se continuar com ela nas fases seguintes do estudo em modelos ventilados. Tais motivos possivelmente expliquem os resultados mais irregulares obtidos com a pneumonia por *P. aeruginosa* no modelo aqui adotado, onde os ratos não eram imunodeprimidos. Os roedores são sabidamente muito resistentes à provocação de infecção em laboratório. No entanto, a pneumonia por *Pseudomonas* representou o modelo de bactéria resistente, comum nas infecções nosocomiais, mesmo que a cepa empregada tivesse sido testada previamente como sensível à amicacina *in vitro*. Este fato também prova que a monoterapia não é efetiva no tratamento de infecções graves pulmonares por *P. aeruginosa*, e, embora a amicacina seja recomendada em combinação com outros antibióticos para tratamento deste patógeno, ela possui uma penetração limitada no pulmão, quando administrada por via sistêmica. No entanto, ela foi escolhida por ser utilizada por outros no tratamento de infecções respiratórias em roedores. A intensidade de consolidação foi menor na pneumonia por *P. aeruginosa* em comparação com o pneumococo. As explicações possíveis podem decorrer de fatores tais como a dose empregada, menor patogenicidade para o rato ou pelo tempo de evolução para o desenvolvimento da lesão pneumônica, embora todos os casos apresentassem pneumonias de graus 2 e 3, definidas como suficientes neste trabalho para o diagnóstico referencial.

Desta forma, estas questões devem ser novamente testadas, em um próximo experimento, usando combinação de antibióticos e realização do LBA em períodos mais longos (72h a 96h ) de evolução.

As vantagens do LBA já foram enfatizadas por outros autores, conforme discutido nos capítulos introdutórios. Ele é mais útil, comparado ao PSB e à AT, na medida em que rastreia uma área maior dos pulmões e consegue obter amostras distais alveolares, além de propiciar maior número de informações pelo acesso aos resultados imediatos do exame direto. Para se obterem tais vantagens, é necessário que os hospitais possuam laboratórios em condições de processar as amostras de imediato, tão logo quanto possível, o que requer sempre um contato prévio do médico que realiza o exame com o técnico do laboratório que avalia a adequação da amostra antes de processá-la, refulgando as com mais de 1% de células epiteliais. O processamento correto das amostras para exame bacterioscópico e citológico deve observar todas as etapas descritas na metodologia deste trabalho, condição nem sempre disponível ou exequível por alguns laboratórios. Sem esse cuidado, o rendimento do exame direto irá diminuir, pois as células são muito suscetíveis às alterações degenerativas que inviabilizam a detecção da BIC. Na experiência deste estudo, a pesquisa da BIC é um método relativamente trabalhoso e exige sua contagem em pelo menos 300 células. Pode haver variabilidade interlaboratórios no processamento das amostras, não só no tempo e rapidez da citocentrifugação como no método de reportar os diferenciais celulares. Neste aspecto foram seguidas as recomendações da ATS<sup>63,87</sup>. A primeira amostra deve ser separada e considerada de origem brônquica e as amostras subsequentes, consideradas de origem alveolar, devem ser reunidas e usadas para microscopia e culturas quantitativas. O transporte deve ser feito em plástico não aderente (polipropileno) e o material processado assim que chegar ao laboratório. O volume amostral mínimo aceitável é de 5ml. As colorações de Wright-Giemsa e do Gram das amostras citocentrifugadas devem ser feitas em duplicata para obter-se uma contagem diferencial em 300 células em campo de alto aumento, excluindo eritrócitos. O resultado deve indicar as percentagens de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais brônquicas, BIC e organismos extracelulares. O Gram deve conter as bactérias extra e intracelulares.

Na comparação dos dois métodos de contagem da BIC, aqui denominado de “aberto” é o utilizado pela maioria dos laboratórios, visto que poucos possuem condições de usar a microscopia gráfica “padronizada”. O método aberto, como demonstrado, faz

uma contagem com um número levemente superior de BIC em relação ao padronizado, que conta somente as células que tocam os eixos do gráfico projetado no campo visual do microscópio. A comparação estatística dos resultados do presente estudo entre os dois métodos, através do *kappa*, mostrou boa concordância (70%), não havendo prejuízo para o diagnóstico pelo emprego de um método em detrimento do outro. Assim também as leituras de BIC em macrófagos ou neutrófilos são concordantes. A leitura nos macrófagos é mais fácil pela coloração de Giemsa, mas freqüentemente são vistas inclusões citoplasmáticas que podem ser confundidas com bactérias já fagocitadas. Neste caso, havendo dúvida, a leitura terá que ser repetida pela coloração do Gram. A leitura da BIC em neutrófilos é mais específica e as células são mais numerosas, mas se degeneram com mais facilidade (25% do total neste estudo) e exigem leitura precoce.

As culturas quantitativas são, entre os resultados do LBA, as mais utilizadas na prática corrente para subsidiar o diagnóstico da pneumonia, pois podem identificar a etiologia e orientar o tratamento. Entretanto, no caso das infecções respiratórias nosocomiais, a tarefa de identificação do agente etiológico esbarra na permanente dificuldade em diferenciar a bactéria colonizante daquela causadora da infecção. O processamento quantitativo é uma tentativa de distinguir infecção de contaminação através de um limiar diagnóstico. Teoricamente nenhum método de coleta endobrônquica é totalmente livre de contaminação, e Rouby<sup>47,48</sup> alerta para a dificuldade em fixar um limiar diagnóstico, pelo menos para a PAVM, devido à distribuição irregular da concentração bacteriana em pacientes submetidos à VM com pneumonia. As concentrações bacterianas de  $10^3$  ufc e  $10^4$  ufc/ml, consideradas suficientes para o diagnóstico, têm sido contestadas pela demonstração de que sua medida pelo LBA não possui uma boa correlação com a concentração bacteriana tecidual<sup>32,47</sup>. No experimento ora desenvolvido, foi possível verificar que culturas com concentrações variáveis, inclusive menores que as apregoadas para o diagnóstico, como o limiar de  $10^2$  ufc/ml, eram verificadas na presença de pneumonia mesmo sem tratamento nos dois modelos. Mais importante, o rendimento das culturas quantitativas é bastante afetado pelo uso de antibióticos quando a bactéria é sensível, o que não ocorre quando a droga é inefetiva, situação semelhante à verificada com humanos. Por tais razões, a interpretação das culturas quantitativas deve sempre levar em conta sua inserção no contexto clínico de cada paciente, em que se deve avaliar conjuntamente a probabilidade de existência de pneumonia, o uso de antibióticos e o momento de realizar o exame, conforme o modelo probabilístico de Baker<sup>72</sup>, já

mencionado no capítulo introdutório. Nas condições do experimento, os animais controles não tiveram culturas positivas, mas, considerando a realidade clínica de pacientes internados em UTI e colonizados sem pneumonia, é improvável que as culturas sejam sempre totalmente negativas e com isso a especificidade do teste seja menor do que a mostrada em nosso estudo. Na pneumonia por *P. aeruginosa*, mesmo com pouca interferência do antibiótico, a sensibilidade do teste foi inaceitavelmente baixa. A dificuldade na obtenção de exames culturais neste tipo de pneumonia encontra paralelo nas coletas de escarro, que possuem menor sensibilidade para o isolamento de Gram-negativos em casos de pneumonia por estes agentes<sup>133,134</sup>. Os resultados deste trabalho revelam que, pelo menos para a pneumonia no rato, as culturas têm baixo poder discriminatório, são pouco acuradas e se mostram inadequadas na presença de antibióticos.

O exame direto das amostras do LBA representa uma das vantagens do teste e gera um resultado mais imediato de orientação diagnóstica e terapêutica, enquanto se aguardam as culturas mais demoradas. O exame citológico das amostras alveolares permite atestar ou não a presença de processo inflamatório pulmonar pelo exame dos neutrófilos e inferir pela presença de infecção pela pesquisa da bactéria fagocitada, que é altamente específica<sup>85,92,107,108,109,110,165,168,179,181</sup>. No entanto, conforme comentado no capítulo introdutório, os estudos clínicos ainda não permitem estabelecer de forma definitiva o valor incremental do exame para o diagnóstico de pneumonia nas diversas situações clínicas e sob efeito de antibióticos. Sob um ponto de vista teórico, embora os antibióticos reduzam a população bacteriana no pulmão, os fagócitos com BIC permaneceriam detectáveis por um tempo maior do que as bactérias livres (BEC) dentro dos fagolisossomas citoplasmáticos, dependendo do tipo de bactéria e sua virulência. Esse fenômeno é mais próprio dos macrófagos, que não morrem e permanecem ativos após a fagocitose, ao contrário dos neutrófilos, que sempre são destruídos neste processo<sup>96,142</sup>. Na presente pesquisa, a sensibilidade da BIC nos animais não-tratados com pneumonia pneumocócica foi de até 100%, a qual, no entanto, caía para 58,0% nos animais que receberam antibióticos. Na infecção por *P. aeruginosa*, a sensibilidade da BIC era intermediária (69%), mas não foi afetada pelo antibiótico. Estes resultados espelham as situações vivenciadas na clínica. Conforme discutido anteriormente, nas pneumonias tratadas por drogas inefetivas ou que se desenvolvem na vigência corrente de antibióticos, a infecção foi causada por agentes resistentes às drogas em uso, e tanto as culturas quanto a pesquisa de BIC não são afetadas pelos mesmos. No entanto, nos casos em que o

antibiótico é efetivo ou foi iniciado há menos de 48h da realização do LBA, os resultados costumam ser negativos e o exame perde sua eficiência. No estudo ora levado a efeito, quando efetivo, o efeito dos antibióticos sobre a BIC foi menos marcado do que sobre as culturas quantitativas, mostrando a necessidade da realização do exame direto em todos os LBAs. A especificidade da BIC permaneceu sempre em 100% por terem sido usados animais controles absolutos, entretanto estes resultados não são diferentes daqueles vistos em estudos clínicos, onde os autores destacam alta especificidade como valor mais importante da BIC, na medida em que sua ausência descartava a possibilidade de pneumonia.

O limiar de 2% para a positividade da BIC foi o com melhor rendimento neste trabalho. Porém, devido ao nosso tipo de grupo controle, onde não havia pneumonia e os testes eram invariavelmente negativos, este fato impediu a construção de uma curva ROC para testar o ponto de corte mais discriminativo da BIC nas várias concentrações, na medida em que a curva fica praticamente desviada sobre o eixo das ordenadas. A BEC teve menor sensibilidade (50%) e comportou-se de forma muito semelhante aos resultados das culturas quantitativas, toda vez que as culturas tinham limiares elevados ( $>10^4$  ufc/ml) e BIC acima de 2%.

A pneumonia provocou neutrofilia no LBA dos animais testados, mostrando uma boa sensibilidade (70%) para neutrofilia igual ou superior a 50% na contagem diferencial do LBA. No entanto, a neutrofilia no LBA não é específica de pneumonia, ocorrendo também em processos inflamatórios não infecciosos, tais como lesão pulmonar aguda e SDRA. Kirtland<sup>50</sup> ressalta que o número de neutrófilos no LBA, quando normal, é altamente específico da ausência de infecção, com o que o presente estudo é concordante. Segundo Meduri<sup>39</sup>, a percentagem média de aumento dos neutrófilos no LBA em pacientes com PAVM varia de 77% a 82%, também vista em pacientes com SDRA. Em experimentos no nosso laboratório em que foram ventilados ratos com regimes agressivos ( $>30$  ml/kg de volume corrente) capazes de causar lesão pulmonar aguda, todos os LBAs mostraram neutrofilia acima de 50%, indicando que somente o diferencial citológico não é útil para o diagnóstico de pneumonia.

Com o objetivo de se verificar o comportamento da BIC conforme o tipo de agente etiológico, procedeu-se à reunião de 7 publicações<sup>29,76,89,108,109,112,117</sup> em que constavam tabelas com o valor da BIC em percentuais e o das culturas quantitativas, em

relação ao diagnóstico de pneumonia, perfazendo um total de 207 pacientes. Nessas séries a BIC tinha resultados falso-positivos desprezíveis (menos de 2,5%) e resultados falso-negativos (BIC negativa, pneumonia presente) de 25% quando a infecção era por Gram-positivos e de 36% quando por Gram-negativos, mas, nas pneumonias por *P. aeruginosa*, o número de falso-negativos subia para 52%, superior aos demais Gram-negativos. Neste presente trabalho experimental, o falso-negativo para pneumonia por *Pseudomonas* situou-se em 31,0%.

Examinando na literatura o desempenho da BIC, somente nos estudos em que foi comparada à histopatologia *post-mortem* em todos os pacientes<sup>49,76,107,109</sup>, vê-se que os autores têm opiniões contraditórias quanto à capacidade do teste na detecção da pneumonia. Nessa discussão, dois ressaltam o bom desempenho da BIC em qualquer aplicação<sup>76,107</sup> e outros dois<sup>49,109</sup> consideram o teste limitado pela sensibilidade diminuída. Possivelmente as opiniões são divergentes por diferenças metodológicas entre os estudos, como a variação do tempo decorrido entre as coletas endobrônquicas e o óbito, o tipo de exame histológico (por biópsia ou exame de todo o pulmão) e o uso ou não de antibióticos. Chastre<sup>107</sup> fez biópsias localizadas por toracotomia logo após o óbito em 20 pacientes sem antibióticos e encontrou uma correlação positiva entre a BIC e o estudo histopatológico. Marquette<sup>76</sup>, em 28 pacientes usando antibióticos, fez necropsia de todo o pulmão e avaliou separadamente cada segmento pulmonar em até 72h após o LBA e afirma que o encontro de BIC é sempre diagnóstico em qualquer limiar e altamente específico. O mesmo autor<sup>46</sup>, em trabalho experimental, mostrou que o grupo tratado com antibióticos apresentou redução das culturas quantitativas ( $10^2$  ufc), mas não negativou a BIC. Papazian<sup>109</sup>, em 28 pacientes, dos quais 40% estavam em uso de antibióticos, comparou as coletas endobrônquicas feitas 15 min após o óbito e os exames histológico e cultural de todo o pulmão, tendo concluído só haver vantagens da BIC com limiares altos de 10% em amostras não-broncoscópicas, mas não nos LBAs colhidos por broncoscopia. Entretanto, esse autor usou resultados de amostras alveolares em que mais de 50% dos neutrófilos examinados estavam degenerados, o que certamente reduz o rendimento do exame. Torres<sup>49</sup>, avaliando 30 pacientes, todos recebendo antibióticos, fez biópsias superficiais por agulha logo após o óbito e encontrou baixas sensibilidade e especificidade para todas as técnicas broncoscópicas. Comparativamente, este experimento, excluído o fato de não terem sido utilizados animais ventilados mecanicamente, procurou ajustar algumas das diferenças metodológicas apontadas nesses quatro estudos clínicos: usou o estudo

histológico de todo o pulmão obtido no momento da realização do LBA, em animais que faziam uso ou não de antibióticos, e pesquisou-se a BIC tanto em macrófagos quanto em neutrófilos, sendo que nestes o grau de degeneração não ultrapassou 25% das células. A sensibilidade nos casos com melhor indicação do exame (animais não-tratados) variou conforme o agente etiológico, sendo 97% a 100% na pneumonia pneumocócica e 67% na por *Pseudomonas*, mas a especificidade e o valor preditivo positivo foram 100%. Estes resultados estão em conformidade com os de Chastre<sup>107</sup> e Marquette<sup>76</sup>. Os casos com pior indicação (animais tratados) mostram sensibilidades inferiores, em torno de 58% a 67%, mas mantêm a alta especificidade, estando estes resultados mais próximos dos relatados por Torres<sup>49</sup> e Papazian<sup>109</sup>. Novamente, o fato mais importante no julgamento do aproveitamento do LBA para o diagnóstico de pneumonias nosocomiais é a correta indicação do exame, individualizando os casos em que ele poderá obter seu melhor rendimento, ou seja, na ausência de antibioticoterapia, ou os casos com má resposta ao tratamento vigente. Desta forma, a generalização do teste para todo e qualquer caso suspeito de pneumonia, sem considerar o contexto clínico, não permitirá obter-se informação com valor incremental para o diagnóstico.

Uma visão geral comparativa entre o rendimento diagnóstico da BIC e das culturas quantitativas, tais como vistos na Tabela 8, com todos os grupos de animais reunidos, permite concluir que a BIC possui melhor sensibilidade (76%) e menor número de falso-negativos (23%) contra uma sensibilidade geral menor (46%) e falso-negativos maiores (55,5%) das culturas quantitativas. Da mesma forma, no presente experimento, a presença de BIC no exame direto obtido precocemente permitia prever em 90% dos casos a possibilidade de cultura positiva no resultado que era fornecido 3 dias após o LBA, e, quando a BIC era negativa, em 96% dos casos a cultura era também negativa. Estes aspectos mostram o grau de confiabilidade da leitura da BIC no diagnóstico precoce da pneumonia. Em 1998, resultados semelhantes foram encontrados em nível clínico por Souweine<sup>116</sup>, onde a redução da sensibilidade da BIC com o uso de antibióticos caía de 71% no grupo sem antibiótico para 67% nos com antibióticos recentes, enquanto a sensibilidade das culturas quantitativas baixava, respectivamente, de 71% para 38%.

Uma publicação do grupo Cook, Brun-Buisson, Guyatt e Sibbald<sup>53</sup> propôs, em 1994, os critérios de referência (*guidelines*) para avaliar novas tecnologias diagnósticas, representando eles uma hierarquia de avaliação mais rigorosa desde os requisitos técnicos até o impacto desses testes na atitude do médico e nos desfechos dos pacientes e para o uso

conciencioso dos recursos médicos. Ao pesquisarem o uso do LBA no diagnóstico da PAVM em uma revisão sistemática da literatura, propuseram a seguinte sequência de avaliação, que se procurou atender no presente trabalho:

1. Habilidade ou capacidade tecnológica para demonstrar suas especificações experimentalmente e na prática clínica. O teste deve demonstrar, em condições laboratoriais ideais, sua utilidade na clínica. Ou seja, para o LBA, o teste tem de ser feito em animais com e sem pneumonia, os quais serão sacrificados para se determinar a acurácia do LBA para o diagnóstico. Assim também na clínica o teste deve usar um padrão de referência (teste-ouro), p. ex. pacientes que morrem, comparando os resultados do LBA com as amostras de pulmão. Ainda devem ser considerados curva de aprendizado, vieses das amostras e habilidade pessoa a pessoa na realização do teste.

Este trabalho feito experimentalmente observou esta questão ao determinar a acurácia do LBA e os resultados do exame direto em animais com e sem pneumonia comparados com o teste-padrão, tendo sido depurado pela fase de aprendizado e aperfeiçoamento do modelo e das amostras bacterianas.

2. O teste provê informações importantes em um número diferente de situações clínicas? Por exemplo, sua utilidade para resolver dilemas clínicos, o efeito dos antibióticos sobre os testes, a comparação com testes semelhantes (LBA, miniLBA, coleta às cegas, etc.) e seu uso em vários tipos de pacientes. O rendimento da técnica ainda deve testar a determinação dos limiares ideais da BIC e das culturas quantitativas e a questão da sensibilidade medíocre com uso de antibióticos. Neste trabalho, simulou-se a situação clínica de tratamento ou não tratamento e se procurou avaliar limiares em pneumonia por cocos Gram-positivos e por Gram-negativos. Entre os dilemas clínicos, além do efeito dos antibióticos, estudou-se o rendimento da BIC entre neutrófilos e macrófagos, os métodos de leitura e de coloração, as correlações dos resultados da BIC, com as culturas e a intensidade da pneumonia.

3. Acurácia diagnóstica: Os testes fornecem uma avaliação mais acurada da presença da doença? E são mais acurados para o diagnóstico de pneumonia? A avaliação válida requer uma comparação independente, cega, com o padrão de referência. Como a histologia é raramente usada na prática diária, o estudo experimental pode fornecer um resultado mais válido. Na prática diária, os médicos têm de usar critérios menos estritos

através de culturas positivas ou negativas, que não fornecem resultados definitivos sobre a acurácia dos LBA. Os estudos clínicos que avaliam o rendimento dos resultados do LBA foram todos feitos em um número pequeno de pacientes, o que determina uma evidência de grau moderado sobre o poder do LBA em diagnosticar pneumonia, e muito poucos usaram o critério histológico. Neste sentido, a utilização do estudo experimental permite avaliar a acurácia dos testes com modelos controlados em laboratório com leitura independente e cega, usando a histologia de forma repetida. Esta questão é aquela mais atendida pelo estudo experimental.

4. Os outros dois requisitos seriam: impacto terapêutico e avaliação dos desfechos: Os médicos fazem modificações sobre decisões terapêuticas a partir dos resultados do teste? A aplicação do teste beneficia os pacientes e seus desfechos? Para ambas o estudo experimental não tem resposta, sendo para tanto necessários ensaios clínicos randomizados, ainda muito difíceis de obter na prática médica com PAVM e outras pneumonias nosocomiais. Neste tipo de estudo os pacientes fazem ou não o LBA como parte da estratégia diagnóstica e seu impacto é avaliado na mortalidade em 28 dias, permanência na UTI ou hospital, duração da intubação traqueal, intervenções terapêuticas e morbidade a longo prazo. O principal obstáculo é a ausência de um critério fácil para a definição da PAVM. Mesmo que os exames sejam acurados, existem poucos dados sobre a influência destes testes em desfechos clínicos importantes. A mudança na prática dos intensivistas irá demonstrar um desserviço se a adoção do LBA ocorrer de forma disseminada e sem critério para todo caso suspeito de pneumonia antes de uma demonstração da sua eficácia e comprovação dos benefícios.

De certo modo, a alusão a Claude Bernard, figura síntese da experimentação, na página de abertura deste trabalho, evidencia a contribuição do método experimental para a validação das técnicas broncoscópicas, possibilitando elucidar o diagnóstico da pneumonia nosocomial mal resolvida ou daquela associada ao ventilador: a relação entre as hipóteses testadas e os resultados obtidos projeta a rentabilidade do exame direto do LBA, a relatividade de sua acurácia não reduzindo a pertinência da testagem experimental. Assim, pois, ao viabilizar a predição do diagnóstico, o método permite mediar a tomada de decisão do médico de uma forma mais segura e eficaz.

Nas palavras de Claude Bernard:

*“On n’arrivera jamais à des généralisations vraiment fécondes et lumineuses sur les phénomènes vitaux, qu’autant qu’on aura expérimenté soi-même, et remué dans l’hôpital, l’amphithéâtre ou le laboratoire, le terrain fétide et palpitant de la vie”.\**

---

\* Os fragmentos de Claude Bernard foram extraídos de: Oster, Pierre. **Dictionnaire de Citations Françaises**, Le Robert, tome 2. Paris: Les Usuels du Robert- Poche, 1990, p.350 e 353.



## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Os principais resultados deste estudo sobre o rendimento diagnóstico do lavado broncoalveolar em modelos experimentais de pneumonia foram:

- 1) O exame direto tem na precocidade e na especificidade do seu resultado o valor incremental mais importante para o diagnóstico de pneumonia e deve ser sempre incluído nos resultados do lavado broncoalveolar.
- 2) O encontro de bactéria fagocitada no exame direto tem sensibilidade elevada e alta especificidade para o diagnóstico de pneumonia em animais que não estejam usando antibióticos.
- 3) O uso de antibióticos reduz a sensibilidade dos testes microbiológicos do lavado broncoalveolar somente quando a pneumonia é tratada com antibiótico efetivo; entretanto, havendo resistência ou inefetividade do tratamento, o rendimento não é afetado.
- 4) A presença da bactéria fagocitada no exame direto no limiar de 2% atesta a presença de pneumonia e, neste modelo experimental, possui maior acurácia diagnóstica do que as culturas quantitativas.

## **7 BIBLIOGRAFIA**

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. Cook DJ; Walter SD; Cook RJ; Griffith LE; Guyatt GH; Leasa D; Jaeschke Z; Brun-Bruissson C. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998; 129:433-40.
2. Craven DE; Epidemiology of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117: 186S-187S.
3. Vincent JL; Bihari DJ; Suter PM; Bruining HA; White J; Nicolas-Chanoin MH et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995; 274:639-44.
4. Fagon JY; Chastre J; Domart Y et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 1989 139:877-84.
5. American Thoracic Society. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;153:1711-25.
6. Andrews JY; Coalson JJ; Smith JD; Johanson WG. Diagnosis of nosocomial pneumonia in acute diffuse lung injury *Chest* 1981; 80:254-58.
7. Bell RC; Coalson JJ; Smith JD; Johanson WG. Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1983; 99:293-98.
8. Gross P; Neu H; Aswapokee P et al. Deaths from nosocomial infections: experience in a university hospital and a community hospital. *Am J Med* 1980; 68:219-23.
9. National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) Report. Data Summary from January 1992 – April 2000, Issued 2000. *Am J Infection Control*. 2000; 28:429-48.
10. Haley RW; Culver DH; White JW; et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol* 1985; 121:182-205.

11. Joshi N; Localio AR; hamory BH. A predictive risk index for nosocomial pneumonia in the intensive care unit. *Am J Med*, 1992; 93:135-42.
12. Fagon JY; Stephan F; Novara A *epidemiologie des pneumopathies acquises sous ventilation artificielle*. Pneumopathie nosocomiale et ventilation artificielle. 1995 Masson. Paris p.1-12.
13. Craven DE; Kunches LM; Kilinsky V; Lichtemberg DA; Make BJ; Maccabe WR. Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation. *Am Rev Resp Dis* 1986; 133:792-96.
14. Silva, NB. *Relatórios do Serviço de Controle de Infecções do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre* (divulgação interna – não publicados).
15. Spiadorello, WP. *Mortalidade por pneumonia nos pacientes em ventilação mecânica*. Tese de doutorado apresentado no Curso de Pós-Graduação em Pneumologia, 1999, UFRGS
16. Langer T; Mosconi P; Cigada M; Mandelli M and the Intensive Care Unit Group of Infection Control. Long -term respiratory support and the risk of pneumonia in critically ill patients. *Am Rev Respir Dis* 1987; 140:302-05.
17. Jimenez P; Torres A; Rodroguéz-Roisin R et al. Incidence and etiology of pneumonia acquired during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1989;17:882-85.
18. Kerverer AJH; Rommes JH; Mevissen-Verhage EAE; Hulstaert PF; et al. Colonization and infection in surgical intensive care patients. A prospective study. *Intensive Care Med* 1987; 13:347-51.
19. Driks MR; Craven DE; Celli BR et al. Nosocomial pneumonia in intubated patients given sucralfate as compared with antacid or histamine type 2 blockers. *N Engl J Med* 1987; 317:1376-82.
20. Koleff MA. Ventilator-associated pneumonia. A multivariate analysis. *JAMA* 1993; 270:1965-70.
21. Celis R; Torres A; Gatell JM; Almeda M; Rodriguez-Roisin R; Agusti-Vidal A. Nosocomial pneumonia: A multivariate analysis of risk and prognosis. *Chest* 1988; 93:318-24.
22. Johanson WG; Seidenfeld JJ; Gomez P; Santos R; Coalson JJ. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:259-64.
23. Fagon JY, Chastre J, Hance AJ et al. Detection of nosocomial lung infection in ventilated patients. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988; 138:110-116.
24. Fagon JY; Chastre J; Hance AJ; Domart Y; Trouillet JL; Gibert C. Evaluation of clinical judgment in the identification and treatment of nosocomial pneumonia in ventilated patients. *Chest* 1993; 103:547-53.

25. Wunderink RG. Clinical criteria in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:191S-194S.
26. Meduri G; Mauldin GL; Wunderink RG; Leeper KV; Jones CB; Tolley E; Mayhall G. Causes of fever and pulmonary densities in patients with clinical manifestations of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1994;106:221-35.
27. Pingleton SK; Fagon JY; Leeper KV. Patient selection for clinical investigation of ventilator-associated pneumonia. Criteria for evaluating diagnostic techniques. *Chest* 1992; 102:553S-56S Suppl.
28. Álvarez-Lerma F; Torres A; Rodríguez de Castro F et al. Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19:479-87.
29. Pugin J; Auckenthaler R; Mili N; Janssens JP; Lew PD; Suter PM. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:1121-29.
30. Papazian L; Thomas P; Garbe L; Guignon I; Thirion X; Charrel J; Bollet C; Fuentes P; Gouin F. Bronchoscopic or blind sampling techniques for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1982-91.
31. Flanagan PG; Findlay GP; Magee JT; Ionescu AA; Barnes RA; Smithies MN. The diagnosis of ventilator-associated pneumonia using non-broncoscopic, non-direct lung lavages. *Intensive Care Med* 2000; 26:20-30.
32. Fabregas, N; Torres, A; El-Biary M; Ramirez, J; Hernandez,C; Gonzalez J; Puig de la Bellacas J; de Anta, J; Rodriguez-Roisin, R: Histopathologic and microbiologic aspects of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology* 1996; 84:760-71.
33. Winer-Muram HT; Rubin AS; Miniati M; Ellis JV. Guidelines for reading and interpreting chest radiographs in patients receiving mechanical ventilation. *Chest* 1992; 102: 565S-70S Suppl.
34. Wunderink RG; Woldenberg LS; Zeiss J et al. The radiologic diagnosis of autopsy-proven ventilator associated pneumonia *Chest* 1992; 101:458-63
35. Wunderink RG. Radiologic diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117: 188S-190S
36. Wunderink RG; Mayhall G; Gibert C. Methodology for clinical investigation of ventilator-associated pneumonia. Epidemiology and therapeutic intervention. *Chest* 1992; 102: 580S- 88S Suppl.
37. Mauldin GL; Meduri GU; Wunderink RG; Leeper KV; Jones CB; Estes RJ. Causes of fever and pulmonary infiltrates in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: A109.
38. Salata R; Lederman MM; Shlaes DM; Jacobs MR; Eckstein E; Tweardy D; Toossi Z; Chmielewski R; Marino J; King CH; Graham RC; Ellner JJ. Diagnosis of nosocomial

- pneumonia in intubated, intensive care unit patients. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 426-32
39. Meduri GU; Chastre J. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992; 102: 557S-64S Suppl.
  40. San Pedro, G. Are quantitative cultures useful in the diagnosis of hospital-acquired pneumonia? *Chest*, 2001; 119:385S-390S.
  41. Niederman MS; Torres A; Summer W. Invasive diagnostic testing is not needed routinely to manage suspected ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:565-69.
  42. Niederman MS. Bronchoscopy for ventilator-associated pneumonia: Show me the money (outcome benefit)!. *Crit Care Med* 1998; 26:198-99.
  43. Niederman MS. Bronchoscopy in nonresolving nosocomial pneumonia. *Chest* 2000; 117:212S-218S.
  44. Koleff MH; Bock KR; Richards RD; Hearns M. The safety and diagnostic accuracy of minibronchoalveolar lavage in patients with suspect ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 1995; 122:743-48.
  45. Seidenfeld JJ; Mullins RC; Fowler SR; Johanson WG. Bacterial infection and acute lung injury in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:22-26.
  46. Marquette CH; Wermert D; Wallet F; Copin MC; Tonnel AB. Characterization of an animal model of ventilator-acquired pneumonia. *Chest* 1999; 115:200-209.
  47. Rouby JJ; De Lassale EM; Poete P; Nicolas MH; Bodin L; Jarlier V; Charpentier Y; Grosset J; Viars P. Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:1059-66.
  48. Rouby JJ. Nosocomial infection in the critically ill. The lung as a target organ. *Anesthesiology* 1996; 84:757-59.
  49. Torres A; Fabregas N; Ewig S; de la Bellacasa JP; Bauer TT; Ramirez J. Sampling methods for ventilator-associated pneumonia: validation using different histologic and microbiologic references. *Crit Care Med* 2000; 28:2799-804.
  50. Kirtland SH; Corley DE; Winterbauer RH; Springmeyer SC; Casey KR; Hampson NB; dreis DF. The diagnosis of ventilator-associated pneumonia. A comparison of histologic, microbiologic, and clinical criteria. *Chest* 1997; 112:445-57.
  51. Marquette CH; Wallet F; Copin MC; Wermert D; Desmidt A; Ramon P; Coucol R; Tonnel AB. Relationship between microbiologic and histologic features in bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1784-87.
  52. Wimberley N; Faling LJ; Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:337-43.

53. Cook DJ; Brun-Buisson C; Guyatt GH; Sibbald WJ. Evaluation of new diagnostic technologies: bronchoalveolar lavage and the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 1994; 22: 1314-1322.
54. Grossman RF. Evidence-based assessment of diagnostic tests for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:177S-181S.
55. Bartlett, JG. Invasive diagnostic techniques in pulmonary infections. In: Pennington, JE *Respiratory Infections. Diagnosis and Treatment*. 1994. Raven Press. New York. p.73-99.
56. Torres A, El-Ebiary M; Padro L; Gonzalez J; Bellacasa JP; Ramirez J; Xaubet A; Ferrer M; Rodriguez-Roisin R.. Validation of different techniques for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am.J.Respir. Care Med*. 1994, 149:324.
57. Kahn FW; Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infections by bronchoalveolar lavage. *J Infect Dis* 1987; 155:862-69.
58. Torres A, Bellacasa JP, Xaubet A, et al. Diagnostic value of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1989, 140: 306-310.
59. Chastre J; Viau F; Brun P; Pierre J; Dauge MC; Bouchama A; Akesbi A; Gibert C. Prospective evaluation of the protected specimen brush for the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:924-29.
60. Baselski VS, Wunderink, RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:533-598.
61. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. State of art. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 135: 250-63.
62. Chastre J; Trouillet JL; Vuagnat A; Joly-Guillou ML; Clavier H; Dombret MC et al. Nosocomial pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1165-72.
63. Goldstein RA; Rohatgi PK; Bergofsky EH et al. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142:481-86.
64. Sanchez-Nieto JM; Torres A; Garcia-Cordoba F; El Biary M; Carrillo A; Ruiz J; Nunez ML; Niederman M. Impact of invasive and noninvasive sampling on outcome of ventilator-associated pneumonia. A pilot study. *Am J respir Crit Care Med* 1998; 157:371-76.
65. Sole-Violan J; Fernandez JA; Benitez AB; Cardenosa Cendrero JÁ; Rodriguez de Castro F. Impact of quantitative invasive diagnostic techniques in the management and outcome of mechanically ventilated patients with suspected pneumonia. *Crit Care Med* 2000; 28:2737-41.
66. Fagon JY; Chastre J; et al. Invasive and noninvasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 2000; 132:621-30.

67. Koleff MH; Ward S. The influence of mini-BAL cultures on patients outcomes: implications for the antibiotic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1998; 113; 412-20.
68. Luna CM; Vujacich P; Niederman MS et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111:676-85.
69. Rello J; Gallego M; Mariscal D et al. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J respir Crit Care Med* 1997; 156:196-200.
70. Trouillet JL; Chastre J; Vuagnat A; Joly-Guillout ML; Combaux D; Dombret MC; Gibert C. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:531-39.
71. Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit: ICU – acquired pneumonia study group. *Intensive care Med* 1996; 22:387-94.
72. Baker AM; Bowton DL; Haponik EF. Decision making in nosocomial pneumonia. Na analytic approach to the interpretation of quantitative bronchoscopic cultures. *Chest* 1995; 107:85-95.
73. Murray PR; Washington JA; Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50:339-44.
74. Borderon E; Leprince A; Gueveler C; Borderon JC. Valeur des examens bactériologiques des sécrétions trachéales. Comparaison avec les résultats des biopsies pulmonares. *Rev Fr Mal Resp* 1981;9:229-39.
75. Marquette CH; Herengt F; Mathieu D; Saulnier F; Courcol R; Ramon P. Diagnosis of pneumonia in mechanical ventilated patients: repeatability of the protect specimen brush (PSB) with quantitative cultures. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 147:211-14.
76. Marquette CH; Copin M-C; Wallet F; Neviere R; Saulnier F; Mathieu D; Durocher A; Ramon P; Tonnel B. Diagnosis tests for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation accuracy using histology as a diagnostic standard. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1878-88.
77. El-Ebiary M; Torres A; Gonzales J; Puig dela Bellacasa; et al. Accuracy of quantitative cultures of endotracheal aspirates for the diagnosis of ventilator associated pneumonia. *Am Rev Respir Dis* , 1993; 148:1552-57.
78. Cook D. Endotracheal aspiration in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:195S-197S.
79. Pham LH; Brun-Buisson C; Legrand P et al. Diagnosis of nosocomial bronchopneumonia in mechanical ventilated patients. Comparison of a plugged telescoping catheter with the protected specimen brush. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:1055-61.

80. Gerbeaux P; Ledoray V; Boussuges A; Monelat F; Jean P; Sainty JM. Diagnosis of pneumonia in mechanically ventilated patients. Repeatably of the bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit car Med* 1998; 157:76-80.
81. Baughman RP. Protected-specimen brush technique in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:203S-206S.
82. Dreyfuss D; Mier L; Lebourdelles G et al. Clinical significance of borderline quantitative protected brush specimen culture results. *Am Rev Rep Dis* 1993; 147:946-51.
83. Thorpe JE; Baughman RP; Frame PT; Wesseler TA; Staneck JL. Bronchoalveolar lavage for the diagnosing acute bacterial pneumonia. *J Infect Dis* 1987; 155:855-861.
84. Xaubet A; Torres A et al. Diagnostic value of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanical ventilated patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:306-10.
85. Agusti C; Torres A. Techniques diagnostiques basées sur le lavage bronchoalveolaire. In: Chastre J; Fagon JY. *Pneumopathie nosocomiale ey ventilation artificielle*. Masson. Paris. 1995. p.71-92.
86. Grossman RF. Evidence-based assessment of diagnostic tests for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:177S-181S.
87. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:48.
88. Baselski VS; El-Torky M; Coalson JJ; Griffin JP. The standardization of criteria for processing and interpreting laboratory specimens in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992; 102: 571S-79S Suppl.
89. Meduri GU. Ventilator-associated pneumonia in patients with respiratory failure. A diagnostic approach. *Chest*, 1990; 97:1208-1209.
90. Kirkpatrick MB; Bass JB Jr. Quantitative bacterial cultures of bronchoalveolar lavage fluids and protect brush catheter specimens from normal subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1989;139:546-48.
91. Brégeon F; Papazian L; Thomas P; Carret V; Garbe L; Saux P; Drancourt M; Auffray JP. Diagnostic accuracy of protected catheter sampling in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2000; 16(5):969-75
92. Torres A; El-Ebiary M. Bronchoscopic BAL in the diagnosis of ventilador-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:198S-202S.
93. Balthazar AB; Nowakonski A; De Capitani EM; Bottini PV; Terzi RG; Araújo S. Diagnostic investigation of ventilator-associated pneumonia using bronchoalveolar lavage: comparative study with a postmortem lung biopsy. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(8):993-1001.

94. Dupont H; Mentec H; Sollet JP; Bleichner G. Impact of appropriateness of initial antibiotic therapy on outcome of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2001; 27:355-62.
95. Dennesen PJ; van der Vem AJ; Kessels AG; Ramsay G; Bonten MJ. Resolution of infectious parameters after antimicrobial therapy in patients with ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1371-75.
96. Vallés J; Rello J; Fernandez R et al. Role of bronchoalveolar lavage in mechanical ventilated patients with suspected pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13:549-58.
97. Solé -Violán J; Castro FR; Luna JC; Benitez AB; Alonso JLM. Comparative efficacy of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheter in the diagnosis of pneumonia in mechanically ventilated patients. *Chest* 1993; 103:386-90.
98. Rouby J-J. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Intens. Care Word.* 1993, 10:145-50.
99. Brun-Buisson C. Techniques diagnostiques non bronchoscopiques par prélèvement distal protégé. In: Chastre J et Fagon JY. *Pneumopathie nosocomiale et ventilation artificielle*. Masson. Paris. 1995. p.93-101.
100. Campbell GD Jr. Blinded invasive diagnostic procedures in ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117:207S-211S.
101. Wunderink RG. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: bronchoscopic versus nonbronchoscopic approach. *Journal of Bronchology* 1997; 4:73-77.
102. Woske H-J; Röding T; Schultz I; Lode H. Ventilator-associated pneumonia in a surgical intensive care unit: epidemiology, etiology and comparison of three bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling. *Critical Care*, 2001; 5:167-73.
103. Rouby JJ; Rossignon, MD; Nicolas MH et al.:A prospective study of protected bronchoalveolar lavage in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Anesthesiology* 1989; 71:679-85.
104. Brégeon F; Papazian L; Gouin F. Éléments du diagnostic des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. *Ann. Fr Anesth Réanim* 1996; 15:1178-92.
105. Courcol RJ; Damien JM; Ramon P; Voisin C; Martin GR. Presence of alveolar macrophages as a criterion for determining the suitability of sputum specimens for bacterial culture *Eur J Microbiol* 1984; 3:122-5.
106. Chastre J; Fagon JY; Soler P; Bornet M; Domart Y; Trouillet JL; Gibert C; Hance AJ. Diagnosis of nosocomial bacterial pneumonia in intubated undergoing ventilation: comparison of the usefulness of bronchoalveolar lavage and the protected specimen brush. *Am J Med.* 1988; 85:499-506.

107. Chastre J; Fagon JY; Bornet-Lecso M; calvat S; Dombret MC; Khani RA; Basset F; Gibert C. Evaluation of bronchoscopic techniques for the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:231-40.
108. Aubas S; Aubas P; Capdevila X; Darbas H; Roustan JP; Cailar J. Bronchoalveolar lavage for diagnosing bacterial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:860-66.
109. Papazian L; Autillo-Touati,A; Thomas, P; Brégeon,F; Garbe L; Saux, P; Seite, R; Gouin,F. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia. An evaluation of direct examination and presence of intracellular organisms. *Anesthesiology*, 1997; 87:268-76.
110. Allaouchiche B; Jaumain H; Dumontet C; Motin J. Early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Is it possible to define a cutoff value of infected cells in BAL fluid? *Chest*. 1996; 110:1558-65.
111. Allaouchiche B; meugnier H; Freney J; Fleurette J; Motin J. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in bronchoalveolar lavage fluid using a DNA probe (Accuprobe). *Intensive Care Med* 1996; 22:683-87.
112. Dotson RG; Pingelton SK. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1993; 103:541-46.
113. Timsit JF; Misset B; Renaud B; Goldstein FW; Carlet J. Effect of previous antimicrobial therapy on the accuracy of the main procedures used to diagnose nosocomial pneumonia in the patients who are using ventilation. *Chest* 1995; 108: 1036-40.
114. Timsit JF; Cheval C; Gachot B; Bruneel F; Wolff M; Carlet J; Regnier B. Usefulness of a strategy based on bronchoscopy with direct examination of bronchoalveolar lavage fluid in the initial antibiotic therapy of suspect ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2001; 27(4):640-47.
115. Meduri GN; Reddy RC; Stanley T; El-Zeky F. Pneumonia in acute respiratory distress syndrome. A prospective evaluation of bilateral bronchoscopic sampling. *Am J Respir Crit Care med* 1998; 158: 870-75.
116. Souweine B; Verber B; Bedos JP; Gachot B; Dombret MC; Regnier B et al. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. *Crit Care med* 1998; 26:236-44.
117. Solé-Violan J; Castro FR; Rey A; Martin-González JC; Cabrera-Navarro P. Usefulness of microscopic examination of intracellular organisms in lavage fluid in ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1994; 106:889-94.
118. Papazian L; Martin C; Meric B; Dumon JF; Gouin F. A reappraisal of blind bronchial sampling in the microbiologic diagnosis of nosocomial bronchopneumonia. A comparative study in ventilated patients. *Chest* 1993; 103:236-42.

119. Mimos O; Karim A; Mazoit JX; Edouard A; Leprince S; Nordmann P. Gram staining of protect pulmonary specimens in the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Br J Anaesth* 2000; 85:735-39.
120. Blot, F; Raynard B; Chachaty CT; Sami Antoun; Nitenberg G. Value of Gram stain examination of lower respiratory tract secretions for early diagnosis of nococomial pneumonia. *A J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1731-37.
121. Duflo F; Allaouchiche B; Debon R; Bordet F; Chassard D. An evaluation of the Gram stain in protected brochoalveolar lavage fluid for the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Anesth Analg* 2001; 92:442-47.
122. Prekates A; Nanas S; Argyropoulou A; Margariti G; Kyprianou T; Papagalos E; Paniara O; Roussos C. The diagnostic Value of Gram stain of bronchoalveolar lavage samples in patients with suspect ventilator-associated pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1998; 30:43-47.
123. Piva E; De Toni S; Servidio G; Borin P; Plebani M. Phagocytic activity of bronchoalveolar lavage neutrophils in intensive care unit patients on mechanical ventilation. *Ann of the NewYork Acad of Sciences* 1998; 832:358-62.
124. Geckler,RW, Gremillion, DH; MacAllister, CK, Ellenbogen,C. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates, *J.Clin.Microbiol.* 1977; 6:396-9.
125. Rein, MF; Gwaltney, JM; O'Brien,WM; Jennings,RH; Mandell,GL Accuracy of gram stain in identifying pneumococci in sputum. *JAMA* 1978; 239:2671-2673.
126. Washington JA. Noninvasive diagnostic techniques for lower respiratory infections. In: Pennington JE *Respiratory Infections. Diagnosis and management* 3<sup>rd</sup> ed. 1994. Raven Press. New York ; 55-71.
127. Bartlett JG; Finegold SM. Bacteriology of expectorated sputum with quantitative culture and wash technique compared to transtraqueal aspirates. *Am Rev Resp Dis* 1978; 117:1019-27.
128. Murray PR; Washington JA; Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50:339-44.
129. Kalin M; Lindberg AA; Tunewall G. Aetiological diagnosis of bacterial pneumonia by Gram stain and quantitative culture of expectorades. Leukocytes and alveolar macrophages as indicators of sample representativity. *Scand J Infect Dis* 1983; 125: 153-60.
130. Levy M; Dromer F; Brion N; Leturdu F; Carbon C. Community-acquired pneumonia. Importance of inical noninvasive bacteriologic and non radiographic investigation. *Chest* 1988; 92:43-8.
131. Morris AJ; Tanner DC; Reller LB. Rejection criteria for endotracheal aspirates from adults *J Clin Microbiol* 1993; 31:1027-9.

132. Baigelman W; Chodosh S; Pizzuto D; Sadow T. Quantitative sputum Gram stains in chronic bronchial disease. *Lung*, 1979;156:265-70.
133. Tillotson JR; Lerner AM. Characteristic of pneumonias caused by *Escherichia coli*. *N Engl J Med*. 1967; 277:115-22.
134. Tillotson JR; Finland M. Bacterial colonization and clinical superinfection of the respiratory tract complicating antibiotic treatment of pneumonia. *J Infect Dis*. 1969;119: 598-623.
135. Geckler RW; Gremillion DH; McAllisterCK; Ellenbogen C. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J Clin Microbiol*. 1977; 6:396-99.
136. Bartlett JG; Breiman RF; Mandell LA; File TM. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management.Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1998; 26:811-38.
137. Moreira JS, Petrillo L. Simultaneous bacteriological examination of sputum and saliva from patients with pulmonary infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1977; 5 ( Supp 1 ): S77.
138. Corley DE; Kirtland SH; Winterbauer RH; Hammar SP; Dail DH; Bauermeister DE, Bolen JW. Reproducibility of the histologic diagnosis of pneumonia among a panel of four pathologists. Analisis of a gold standard. *Chest* 1997; 112:458-65.
139. Silva, NB, Dias,C; Madke G; Pilla,ED; Martins L; Tonietto T; Anflor Jr.LC; Buffon R; Cardoso PG. Relação entre difrentes tipos e concentração de inóculos bacterianos intrabrônquicos e o desenvolvimento de infecção em um modelo experimental de pneumonia em ratos imunocompetentes. *Jornal de Pneumologia*. 2000; 26S (3 ): S27
140. Gundersen HJG; Bendtsen TF et al. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 1988; 96:379-94.
141. Weibel ER Stereological methods. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. E R Weibel. 1 ed. New York, Academic Press. 1980.
142. Reynolds HY. Lung host defenses: a status report. *Chest* 1979; 75:. S39-42
143. Toews G, Gross GN,PeirceAK. The relationship of inoculum size to lung bacterial clearance and phagocytic response in mice. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1979; 120:559-66.
144. Onofrio JM; Toews GB; Lipscomb MF; Pierce AK. Granulocyte-alveolar-macrophage interaction in the pulmonary clearance of *Staphylococcus aureus*. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:335-41.
145. Martin TR, Ruzinski JT, Rubens CE, Chi EY, Wilson CB. The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B. *streptococci* from the lungs of infant and adult rats. *J.Infect.Dis*. 1992, 165(2):306-14.

146. Rezaliguia S, Garat C, Delclaux C. et al. Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 1997, 99:325-35.
147. Johanson WG; Higuchi JH; Woods DE; Gomez P; Coalson JJ. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection in hamsters. Role of oxygen-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:358-61.
148. Piroth L; Martin L; Coulon A; Lequeu C; Duong M; Buisson M; Portier H; Chavanet P. Development of a new experimental model of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia and amoxilin treatment by reproducing human pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2484-92.
149. Frimodt-Moller N; Bentzon MW; Thomsen VF. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect for 14 cephalosporins. *J Infect Dis* 1986; 154:511-17.
150. Vanderzwan J; MacCaig L; Mehta S; Joseph M; Whitsett J; MacCormack DG; Lewis JF. Characterizing alterations in the pulmonary surfactant systems in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Eur Respir J* 1998; 12:1388-96.
151. Knudsen JD, Frimodt-Moller N, Espersen F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39:1253-58.
152. Knudsen JD, Frimodt-Moller N, Espersen F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39:1253-58.
153. Tateda K, Takashima K, Miyazaki H. et al. Noncompromized penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40:1520-25.
154. Galvada J, Capdevila JA, Almirante B. et al. Treatment of experimental pneumonia due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41:795-801.
155. Pennington JE, Stone RM. Comparison of antibiotic regimens for treatment of experimental pneumoniae due to *Pseudomonas*. *J. Infect. Dis.* 1979, 140:881-89.
156. Bergeron Y; Ouellet N; Deslauriers AM; Simard M; Olivier M; Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66(3):912-22.
157. Mah MP, Aeberhard EE, Gilliam MB, Sherman MP. Effects of pentoxifyline on *in vivo* leukocyte function and clearance of group B. *streptococci* from preterm rabbit lungs. *Crit. Care Med.* 1993, 21(5):12-20.

158. Buret A, Dunkley ML, Pang G, Clancy RL, Cripps AW. Pulmonary immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats roles of alveolar macrophages tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 alpha. *Infect. Immun.* 1994, 62 (12):5335-43.
159. Pikaar Jc, Voorhout WF, van Golde LM, Verhoef J, Van Strijp JÁ, van Iwaarden JF. Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J.Infect. Dis.* 1995, 172 (2):481-9.
160. Ernst EJ; Hashimoto S; Guglielmo J; Sawa T; Pittet JF; Kropp H; Jackson JJ; Wiener-Kronish JP. Effects of antibiotic therapy on *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury in a rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2389-94.
161. Sherman MP, Johnson JT, Rothlein R, Hughes BJ, Smith CW, Anderson DC. Role of pulmonary phagocytes in host defense against group *B. streptococci* in preterm versus term rabbit lung. *J.Infect Dis.* 1992, 166 (4):818-26.
162. Mancuso P; Standiford TJ; Marshall T; Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 1998; 66:5140-46.
163. Jean D; Rezaigua-Delclaux; Delacourt C; Leclercq R; Lafuma C; Brun-Bruissson C; Harf A; Delclaux C. Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1702-08.
164. Dedhia HV; Vallyathan JYC; Dadal NS; Banks D; Flink EB; Billie M; Barger MW; Castranova V. Exposure of rats to hyperoxia alteration of lavage parameters and macrophage function. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:1-13.
165. Rosseau S, Seeger W, Pralle H, Lohmeyer J. Phagocytosis of viable *Candida albicans* by alveolar macrophages: flow cytometric quantification. *Am. J. Physiol.* 1994, 267 (2 Pt 1):211-7.
166. Crouch TW; Coalson JJ. Pathogenesis and prevention of nosocomial pneumonia in a nonhuman primate model of respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:502-504.
167. Sherman MP, Johnson JT, Rothlein R, Hughes BJ, Smith CW, Anderson DC. Role of pulmonary phagocytes in host defense against group *B streptococci* in preterm versus term rabbit lung. *J.Infect Dis.* 1992, 166(4):818-26.
168. Meduri GU; Estes RJ. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: II. The lower respiratory tract. *Intensive Care Med* 1995; 21: 452-61.
169. Pennington JE, Stone RM. Comparison of antibiotic regimens for treatment of experimental pneumoniae due to *Pseudomonas* *J.Infect.Dis.* 1979, 140:881-89
170. Holian A, Scheule RK. Alveolar macrophage biology. *Hospital Practice* 1990; 25:53-62.

171. Kunkel SL; Strieter RM. Cytokine networking in lung inflammation. *Hosp.Practice* 1990; 25:55-68.
172. Martin TR; Pistorese BT; Hudson LD; Maunder R. The function of lung and blood neutrophils in patients with the adult respiratory distress syndrome. Implications for the pathogenesis of lung infections. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:254-62.
173. Moussa K; Michie HJ; Cree IA; McCafferty AC; Winter JH; Dhillon DP; Stephens S; Brown RA. Phagocyte function and cytokine production in community acquired pneumonia. *Thorax* 1994; 49:107-11.
174. Rothe G; Kellermann W; Valet G. Flow cytometric parameters of neutrophil function as early indicators of sepsis – or trauma – related pulmonary or cardiovascular organ failure. *J Lab Clin Med* 1990; 115:52-61.
175. Stockley RA. Role of inflammation in respiratory tract infections. *Am.J.Med.* 1995; 99(suppl 6B):6B-8S a 6B-13S.
176. Bonten MJM; Froom AHM; Gaillard CA et al. The systemic inflammatory response in the development of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1105-13.
177. Clawson CC; Repine JE. Quantitation of maximal bactericidal capability in human neutrophils. *J Lab Clin Med* .1976; 88:316-27.
178. Owen CA, Campbell MA, Boukedes SS, Stockley RA, Campbell EJ. A discrete subpopulation of human monocytes expresses a neutrophil-like proinflammatory (P) phenotype. *Am.J.Physiol* 1994; 267:L775-85.
179. Dedhia HV; Vallyathan JYC; Dadal NS; Banks D; Flink EB; Billie M; Barger MW; Castranova V. Exposure of rats to hyperoxia alteration of lavage parameters and macrophage function. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:1-13.
180. Nibbering PH; van den Barselaar MT; van de Gevel JS; Leijh PC; van Furth R. Deficient intracellular killing of bacteria by murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1(5):417-22.
181. Tuomanen EI; Massure HR. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. In Tomasz A. *Streptococcus pneumoniae. Molecular biology and mechanisms of disease.* 1996; Mary Ann Liebert, Inc Publishers. New York, 295-308.
182. Brannen AL et al. *Am J Pathol* 1988; 132: .161-66.

## **ANEXO**

## **ANEXO**

### **Descrição da Fase III: Estudo experimental do rendimento diagnóstico do lavado broncoalveolar na pneumonia em ratos com lesão pulmonar aguda primária induzida pela ventilação mecânica**

#### **Introdução da Fase III**

Nesta fase, está sendo estudado o rendimento das amostras do lavado broncoalveolar usando a metodologia empregada nas duas fases precedentes, comparando animais submetidos à ventilação mecânica. Para tanto, os animais são ventilados por um período mínimo de 4h sob dois modos de regime ventilatório: um “agressivo”, com volumes altos (>30ml/kg) capaz de causar Lesão Pulmonar Aguda (LPA), por dano alveolar direto pelo ventilador, com reação inflamatória pulmonar e conseqüente alteração da oxigenação, complacência e volumes pulmonares; e outro com regime ventilatório normal “protetor” (volumes de 8ml/kg).

Os objetivos maiores desta fase são o de se estudar o efeito da ventilação mecânica sobre os pulmões com e sem infecção associada.. Estão sendo analisados o comportamento e as características do processo pneumônico na presença de LPA, utilizando o lavado broncoalveolar (citologia, microbiologia e dosagem de citocinas) e a histopatologia como testes diagnósticos, feitas logo após o sacrifício dos animais, na diferenciação das lesões decorrentes da pneumonia associada à ventilação daquelas decorrentes somente do processo inflamatório provocado pelo dano alveolar exclusivo sem pneumonia.

A demonstração da presença da lesão pulmonar aguda (LPA) ou o dano alveolar difuso causado pela aplicação da ventilação mecânica nos animais anestesiados, será analisada através de parâmetros de referência: físicos (alteração da complacência pulmonar), bioquímicos (oxigenação, marcadores de resposta inflamatória, níveis de fosfolípido) e histopatológicos (presença do dano alveolar). Será testada a aplicabilidade do modelo em nosso laboratório e a capacidade de sobrevivência dos animais após a recuperação anestésica na presença de LPA.

## **Método**

Animal: rato Wistar adulto imunocompetente com peso médio de 300g.

Anestesia: Tiopental sódico 5mg/kg intraperitoneal, intubação oro-traqueal.

Ventilação mecânica: ventilador Harvard Apparatus mod.683 para pequenos animais, FiO<sub>2</sub>:100%, FR: 10 mpm; VAC: 40 ml/kg; PEEP: 5 cm H<sub>2</sub>O. Tempo 4h.

### **Distribuição dos grupos de estudo:**

Grupo G 3.0 = ventilação com volumes correntes de 40ml/kg: (N=10) anestesia com tiopental intraperitoneal, intubação endotraqueal (ou traqueostomia), ventilação mecânica, pelo período de 4h, canulação da artéria carótida. São colhidas gasometrias arteriais no início do experimento, 2h e 4h, através de canulação da carótida. Monitoração da mecânica respiratória através de monitor Takaoka mod.Ventcare, adaptado para ventilação de pequenos animais. São medidos : volumes de ar corrente, complacências estáticas, resistências das vias aéreas, fluxos pulmonares, curvas P/V. Ao término das 4h é realizado o LBA, e coleta de amostras para microbiologia, citologia, TNF e fosfolípidos. Os pulmões são retirados e medidos o seus pesos seco e úmido.

Grupo G 3.1 = ventilação com volumes correntes de 8ml/kg: (N=10) mesma metodologia descrita acima, sacrifício ao término das 4h, quando então serão sacrificados para realização do LBA e a retirada dos pulmões para Histopatologia.

Grupo G 3.2 = ventilação com volumes correntes de 20 ml/kg + inoculação endobrônquica de *P. aeruginosa* (8Log<sub>10</sub> ufc/ml) com tratamento: (N=10) mesma técnica de ventilação mecânica por 4h descrita acima realizada após a inoculação endobrônquica com *P. aeruginosa*. Sacrifício após 4h de ventilação, realizando o LBA, retirada dos pulmões para exame Histopatológico.

### **Variáveis a serem analisadas**

1. Gerais: Peso inicial e final dos animais, aspecto geral (atividade, prostração, febre); mortalidade espontânea.
2. Gasometria arterial: 0 min; 2h; 4h; 24h (variáveis de oxigenação: PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, sat Hb, DA-aO<sub>2</sub>).
3. Medidas de mecânica respiratória: pressões e resistências de via aérea, complacência estática e dinâmica, volumes correntes e PEEP.
4. LBA: dosagem de TNF- alfa, fosfolipídeos, proteínas totais em 0h e 4h de VM.
5. Culturas quantitativas em ufc/ml.
6. Citologia: contagem diferencial das células, presença de BIC, citomorfometria.
6. Patologia: histopatologia por HE, graduação histopatológica da pneumonia e lesão pulmonar, histomorfometria.