



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas

Small Colony Variants de Staphylococcus aureus nas Infecções respiratórias crónicas de Fibrose Quística

Ana Cristina Caldeira Caraban



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infecciosas
Regente: Prof.^ª Doutora Emília Valadas

***Small Colony Variants de Staphylococcus aureus* nas Infecções respiratórias crónicas de Fibrose Quística**

Ana Cristina Caldeira Caraban

Orientado por:

Dr.^ª Aida Pereira

Novembro'2020

Resumo

Staphylococcus aureus é o agente oportunista mais frequentemente isolado nas secreções respiratórias dos doentes com Fibrose Quística. Esta bactéria persiste durante períodos extensos nas vias aéreas apesar de esquemas antimicrobianos agressivos e repetitivos. Durante a colonização pulmonar crónica, *S. aureus* é exposto a numerosas pressões seletivas impostas pelo ambiente dinâmico e hostil do pulmão de FQ, levando ao estabelecimento de uma população bacteriana heterogénea fenotípica. *Small Colony Variants (SCV)* é uma subpopulação bacteriana auxotrófica de crescimento lento que exhibe características morfológicas, fisiológicas e metabólicas distintas, que facilitam o desenvolvimento de infeções persistentes, recorrentes e refratárias a terapêutica *standard*. O diagnóstico laboratorial de *SCV* de *S. aureus* representa um desafio para o microbiologista clínico, dado que requiere a aplicação de métodos de diagnóstico especiais, não empregados rotineiramente pela maioria dos laboratórios clínicos de FQ. Até a data, poucos laboratórios clínicos reportam a presença de isolados de *SCV* de *S. aureus*.

Estudos epidemiológicos demonstraram que doentes pediátricos tal como adultos estão frequentemente colonizados por *SCV* de *S. aureus*. A idade avançada, exposição prévia a Sulfametoxazol-trimetoprim, coinfeção com *Pseudomonas aeruginosa* e declínio da função pulmonar constituem fatores de risco independentes para emergência de *SCV* de *S. aureus*. São necessários mais estudos para determinar se a presença de *SCV* de *S. aureus* representa um marcador de doença pulmonar avançada ou se desempenha um papel patogénico na progressão da doença pulmonar.

As implicações diagnósticas e clínicas de *SCV* de *S. aureus* enfatizam a importância da monitorização e vigilância deste fenótipo, de forma a aumentar o conhecimento do seu significado clínico na doença pulmonar na FQ.

Palavras-chave: *Small Colony Variants*, *Staphylococcus aureus*, Fibrose Quística, Adaptação, Persistência

“O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados”.

Abstract

Staphylococcus aureus is the opportunist pathogen most isolated from respiratory secretions of people with Cystic Fibrosis (CF). These bacteria often persists in the airways for extended periods despite aggressive and repetitive antimicrobial regimens. During chronic lung colonization, *S. aureus* is exposed to numerous selective pressures imposed by the dynamic and hostile environment of the CF lung, leading to the establishment of a phenotypic heterogeneous bacterial population. *Small Colony Variants (SCV)* constitute a slow-growing auxotrophic bacterial subpopulation that exhibits distinctive morphological, physiological and metabolic characteristics, which facilitates the development of persistent, relapsing infections and refractory to standard antimicrobial therapy.

The laboratorial diagnosis of *S. aureus SCV* represents a challenge for the clinical microbiologist, since it requires special diagnostics methods, not applied in routinely by most of CF clinical laboratories. To date, few clinical laboratories report the presence of *S. aureus SCV* isolates.

Epidemiological studies demonstrated that pediatric and adults patients are commonly colonized by *S. aureus SCV*. Older age, prior exposition to trimethoprim-sulfamethoxazole, coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* and worse lung function constitute independent risk factors for the emergency of *S. aureus SCV*. It is necessary further studies to determinate whether the presence of *SCV S. aureus* represent a marker of more advanced pulmonary disease or plays a pathogenic role on pulmonary disease progression.

The clinical implications of *S. aureus SCV* underscores the importance of surveillance and monitorization of this phenotype, in order to enhance the understanding of their clinical significance of CF pulmonary disease.

Keywords: *Small Colony Variants, Staphylococcus aureus, Cystic Fibrosis, Adaptation, Persistence.*

“O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados”.

Índice Geral

Resumo	3
Abstract.....	4
Índice Geral	5
Lista de acrónimos.....	6
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	7
Introdução.....	8
Métodos e Pesquisa Bibliográfica	10
Adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> nas vias aéreas da Fibrose Quística.....	11
Patogénese das Infecções respiratórias por SCV de <i>S. aureus</i> na FQ	12
Diagnóstico Microbiológico	16
Epidemiologia.....	24
Implicações clínicas da colonização-infecção das vias aéreas por SCV de <i>S. aureus</i>	28
Conclusão	31
Agradecimentos	32
Bibliografia.....	33
Anexos	42

Lista de acrónimos

ACFDR - *Australian Cystic Fibrosis Data Registry* - Registo nacional de doentes com Fibrose Quística Australiano

BPA - agar Baird-Parker

BHIA - *Brain-heart infusion agar*

CBA - agar Columbia sangue

COFF - *Cystic Fibrosis Foundation* – Fundação Americana de Fibrose Quística

CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* – Instituto de Referências Clínicas e Laboratoriais

ECFS - *European Cystic Fibrosis Society* – Sociedade Europeia de Fibrose Quística

FQ - Fibrose Quística

Hem-SCV- *Haemin-dependent small-colony variants*

HQNO - 4- hidroxí-2-hetilquinolona-N-oxido

MALDI-TOF MS - *Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry*

Men-SCV - *Menadione-dependent small-colony variants*

MSA - Agar manitol salgado

MSSA - *Staphylococcus aureus sensível a meticilina*

MRSA - *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SAID - agar *S. aureus* ID

SASCV - *Staphylococcus aureus Small Colony Variants*

SCV - *Small Colony Variants*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

TD-SCV- *Thymidine-dependent small-colony variants*

TSA - *Tryptic Soy agar*

Lista de Figuras

Figura 1. Crescimento de colónias mistas de <i>S. aureus</i> (seta preta) e <i>SASCV</i> (seta branca) de secreções respiratórias de doentes com FQ. Adaptado de Kahl, BC <i>et al.</i> , (2016) e O’Melter <i>et al.</i> , (2010) ^(2,54) . A- Agar de sangue; B- Colónias de <i>SASCV</i> com aspeto em “fried-egg”	17
Figura 2. Crescimento em cultura de colónias mistas de <i>S. aureus</i> (setas pretas) e <i>SASCV</i> (setas brancas) de secreções respiratórias de doentes com FQ. Adaptado de Kahl, BC <i>et al.</i> , (2016) e O’Melter <i>et al.</i> , (2010) ^(2,54) . A- Agar Columbia de sangue; B- Agar cromogénico SAID.....	20
Figura 3. Prevalência dos microrganismos respiratórios em doentes com FQ específico da faixa etária, segundo o Relatório anual de CFF de 2018 ⁽¹⁰⁾	25
Figura 4. Prevalência dos microrganismos respiratórios em doentes com FQ nos E.U.A, durante o período de 1992-2018, segundo o Relatório anual de 2018 da CFF ⁽¹⁰⁾	26

Lista de Tabelas

Tabela 3. Características fenotípicas de <i>S. aureus</i> e <i>SASCV</i> . Adaptada de Von Eiff <i>et al.</i> , (2007) e Kahl <i>et al.</i> , (2016) ^(2,52)	18
Tabela 4. Percentagem de sensibilidade de meios de cultura para o crescimento do fenótipo <i>SASCV</i> , adaptada de Kipp <i>et al.</i> , (2005) ⁽⁶⁸⁾	19
Tabela 1. Estudos de prevalência de <i>SASCV</i> das secreções respiratórias de doentes com Fibrose Quística, publicados desde o ano 1998.....	42
Tabela 2. Padrões de colonização das vias aéreas na Fibrose Quística, segundo a definição do <i>EuroCareCF Working Group</i> ⁽¹⁵⁾	45

Introdução

A Fibrose Quística (FQ) é a doença hereditária letal mais frequente na população caucasiana, registando-se mais de 90,000 indivíduos afetados em todo o mundo^(1,2).

Esta é uma doença autossômica recessiva causada pela mutação do gene *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossoma sete⁽³⁾. Este gene, do qual existem 2089 mutações identificadas⁽⁴⁾, codifica uma proteína transmembranar localizada na região apical das células epiteliais das glândulas exócrinas, regulando o transporte transepitelial hidroeletrolítico^(3,5). A disfunção de CFTR resulta em alterações da composição e propriedades físicas de várias secreções exócrinas (ex. suor, muco), no comprometimento da clearance mucociliar das vias aéreas e na desregulação de vários mecanismos da resposta imune da mucosa respiratória^(3,6). Estas anomalias funcionais associadas a ampla expressão epitelial da proteína CFTR no organismo, dá origem a uma doença multissistémica crónica e progressiva, caracterizada pelo seu alargado e heterogéneo espectro de manifestações clínicas, especialmente dos aparelhos respiratório (infecções respiratórias e dos seios perinasais), digestivo (insuficiência pancreática, cirrose biliar, má absorção, diabetes), reprodutor e das glândulas sudoríparas^(3,7,8).

Nos últimos anos, o seguimento multidisciplinar dos doentes em centros especializados de FQ, a implementação dos programas de rastreio neonatal e de diagnóstico precoce, a evolução técnica de terapêuticas direcionadas aos sintomas e complicações associadas a doença, tal como o desenvolvimento recente de fármacos moduladores e corretores da proteína disfuncional contribuíram significativamente na melhoria da qualidade de vida e esperança média de vida dos doentes, atualmente estimada acima dos 40 anos de idade⁽⁸⁻¹¹⁾.

Apesar destes avanços, a evolução e gravidade da doença pulmonar mantém-se como o principal fator determinante no prognóstico destes doentes⁽¹²⁾. Esta população apresenta uma suscetibilidade para a colonização e desenvolvimento de infeções respiratórias por um grupo específico de agentes oportunistas⁽¹³⁾, adquiridos numa sequência temporal dependente da idade⁽⁷⁾ e quase impossíveis de erradicar apesar do uso de esquemas antimicrobianos apropriados e intensivos, evoluindo num quadro de infeções polimicrobianas crónicas e persistentes alternadas por exacerbações pulmonares intermitentes⁽⁸⁾. A persistência destas infeções conduzem a um ciclo vicioso de

inflamação e de cicatrização do parênquima pulmonar, levando a lesões pulmonares estruturais irreversíveis e a deterioração progressiva da função pulmonar culminando inevitavelmente em Insuficiência respiratória, esta constituindo a principal causa de morte dos doentes^(3,8).

Por este fundamento, as principais estratégias terapêuticas no seguimento destes doentes integram: a prevenção da colonização dos microrganismos respiratórios patogénicos, o uso de esquemas de erradicação na colonização inicial, o tratamento das infeções respiratórias crónicas e a prevenção das exacerbações pulmonares. Estas estratégias tem como objetivo retardar o declínio da função pulmonar destes doentes, recorrendo principalmente ao uso de esquemas antimicrobianos agressivos e repetitivos, estes orientados segundo o exame microbiológico das amostras respiratórias e quadro clínico do doente^(12,14,15).

Staphylococcus aureus foi o primeiro microrganismo patogénico associado as infeções respiratórias da FQ⁽¹⁶⁾, constituindo o principal responsável pela morte destes doentes na era pré-antibiótica^(12,13). Nas últimas duas décadas assistiu-se a um aumento da prevalência da infeção por *S. aureus* nos doentes com FQ, particularmente das estirpes *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* (MRSA). Isto constitui um novo desafio na FQ, dado que o papel patogénico de *S. aureus* no estabelecimento e progressão da doença pulmonar da FQ não esta esclarecido e a evidência existente acerca do impacto clínico da antibioterapia anti-estafilocócica é controversa^(17,18), repercutindo-se na ausência de consensos internacionais quanto a sua abordagem e tratamento^(17,18).

Estudos longitudinais suportam que *S. aureus* persiste durante meses e até anos nas vias aéreas dos doentes com FQ, colonizados predominantemente por uma única linhagem clonal⁽¹⁹⁻²¹⁾, na qual sofrem extensas alterações genóticas e fenóticas não totalmente compreendidas, que lhe permitem adaptar-se ao meio hostil e altamente seletivo que é o pulmão da FQ^(19,22,23). Uma das várias estratégias adaptativas apontadas é a seleção de *Small Colony Variants* (SCV), uma variante morfológica e fenotípica específica descrita em vários microrganismos patogénicos da FQ⁽²⁴⁾, e cujo isolamento tem sido associado a infeções persistentes, recorrentes e refratárias a terapêutica antimicrobiana⁽²⁵⁾.

Durante décadas, o isolamento de SCV de *S. aureus* (SASCV) tem sido reportado nas secreções respiratórias dos doentes com FQ⁽²⁾, citando seu difícil diagnóstico microbiológico segundo os procedimentos de rotina do laboratório clínico de FQ^(2,26,27).

O estudo e caracterização desta variante fenotípica tem permitido elucidar a dinâmica da colonização e infeção respiratória por *S. aureus* no contexto da FQ⁽²⁸⁾.

Com a elaboração deste trabalho pretende-se realizar uma revisão da literatura disponível sobre a colonização-infeção de *SASCV* nas vias aéreas de doentes com FQ, resumizando sua patogénese, mostrando dados epidemiológicos disponíveis e descrevendo os métodos diagnósticos utilizados. Finalmente, discute-se as suas implicações clínicas e a importância da deteção e monitorização de *SASCV* na população com FQ, de forma a elucidar o seu papel e impacto clínico na progressão da doença pulmonar da FQ.

Métodos e Pesquisa Bibliográfica

Para a elaboração deste trabalho, foram consultadas as bases de dados: *B-on*, *PubMed* e *Scopus* e foram pesquisados os termos “*Staphylococcus aureus small colony variants*” e a combinação dos termos: “*Cystic Fibrosis*”, “*adaptation*”, “*persistence*”, “*Staphylococcus aureus infection*”, “*epidemiology*”, “*MRSA*”, “*Portugal*” em artigos de língua inglesa, portuguesa e espanhola com data de publicação até 29/04/2020. Foram ainda analisados artigos citados da bibliografia anterior e acedidos os websites da Direção Geral de Saúde (DGS), da Sociedade Europeia de Fibrose Quística (ECFS), da Fundação Americana de Fibrose Quística (CFF) e outros registos nacionais de doentes (Reino Unido e Austrália), com o objetivo de consulta de *guidelines* e dados epidemiológicos recentes.

Adaptação de *Staphylococcus aureus* nas vias aéreas da Fibrose Quística

S. aureus é uma bactéria Gram-positivo comensal e patogénica humana⁽²⁹⁾. Cerca de 30-40% da população geral estão colonizados assintomaticamente por esta bactéria, constituindo a mucosa nasal o seu principal reservatório⁽³⁰⁾. Simultaneamente, esta bactéria pode causar uma plethora de infeções, incluindo as infeções respiratórias na FQ^(29,30).

Os mecanismos pelos quais a disfunção de CFTR leva a elevada suscetibilidade dos doentes com FQ para a colonização e desenvolvimento de infeções respiratórias por *S. aureus* não estão totalmente compreendidos, constituindo uma das principais áreas de investigação na FQ⁽³¹⁾.

As alterações das propriedades viscoelásticas das secreções respiratórias, a diminuição da clearance mucociliar das vias aéreas, a maior aderência bacteriana às células epiteliais respiratórias, a presença de um recetor específico bacteriano na superfície apical das células epiteliais e o comprometimento das defesas imunitárias da mucosa respiratória constituem algumas das alterações que tem sido implicados na colonização bronco-pulmonar por *S. aureus*⁽³²⁾.

S. aureus é um dos primeiros microrganismos a colonizar e infetar as vias aéreas dos doentes com FQ⁽³³⁾. Após estabelecida a sua colonização, esta bactéria multiplica-se e persiste durante meses, anos e até décadas nas vias dos doentes com FQ^(19,21) apesar do uso de esquemas antibióticos quer em regime profilático e intermitente, colonizados por uma linhagem clonal predominante^(18,32-34).

As vias aéreas da FQ englobam vários microambientes físico-químicos e nutricionalmente heterogéneos^(5,35), promovidos por variações da: resposta imunitária do hospedeiro, hipoxia e diferentes pressões de oxigénio, disponibilidade de nutrientes, interações entre os microrganismos do microbioma e as frequentes intervenções terapêuticas⁽⁵⁾. A exposição crónica destes microambientes conduzem a numerosas e diversas pressões seletivas, desencadeando o processo de adaptação pulmonar de *S. aureus*^(2,5,19-21).

A elevada plasticidade genómica e versatilidade metabólica mostrada por *S. aureus* determina a sua capacidade para sobreviver e adaptar-se com sucesso ao ambiente hostil

e dinâmico das vias aéreas da FQ^(5,6,19). Até a data, vários mecanismos tem sido identificados, tais como: rearranjos do genoma bacteriano, a formação de biofilme, diminuição da expressão de fatores de virulência, ocorrência de estirpes hipermutáveis, a persistência intracelular e a formação das variantes fenotípicas SCV e mucoide⁽¹⁸⁻²¹⁾. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos adaptativos exercidos por esta bactéria durante a sua persistência nas vias aéreas dos doentes com FQ e dos seus fatores desencadeantes, ainda é limitado e pouco compreendido^(19,20).

Ao longo da duração da infecção, *S. aureus* assimilam diferentes e importantes características genotípicas⁽¹⁹⁾ e fenotípicas⁽²⁰⁾, selecionadas pelo meio dinâmico e hostil das vias aéreas da FQ. Estas alterações resultam na formação de uma população bacteriana heterogênea única para cada indivíduo, apesar de colonizados pela mesma linhagem clonal⁽²⁰⁾.

Assim, o processo de adaptação de *S. aureus* nas vias aéreas da FQ descreve-se como um processo gradual e extremamente complexo, o qual não segue um padrão uniforme mas diverso e nos quais os fatores do hospedeiro desempenham um papel relevante⁽²⁰⁾.

Patogénese das Infecções respiratórias por SCV de *S. aureus* na FQ

SASCV apresenta características que promove a sua adaptação otimizada e persistência a longo-prazo nas vias aéreas dos doentes com FQ, mesmo na ausência da sua estirpe parental⁽³⁴⁾. Estudos de análise da prevalência e persistência de SASCV em doentes com FQ cronicamente colonizados por *S. aureus* demonstraram uma significativa taxa de colonização por SASCV e maior extensão da sua persistência em comparação com a sua estirpe parental^(18,32,34). Estes resultados corroboram que a ocorrência de SASCV nas vias aéreas dos doentes com FQ constitui uma estratégia de sobrevivência de *S. aureus*⁽²⁵⁾.

Persistência Intracelular

A patogénese da bactéria *S. aureus* depende da expressão de múltiplos fatores de virulência (ex. proteínas de superfície, toxinas e péptidos) que participam na adesão

bacteriana das células e tecidos do hospedeiro e na evasão das suas defesas imunitárias, promovendo a sua colonização e infecção^(36,37). Para além destes mecanismos, vários estudos suportam que este organismo tem a habilidade de invadir diversas células eucarióticas (ex. macrófagos, células epiteliais e endoteliais, osteoblastos, fibroblastos), sendo recentemente reconhecido como um agente patogénico facultativo intracelular^(38,39).

No contexto da FQ, vários modelos de infecção *in vitro* sugerem que *S. aureus* tem a habilidade de invadir as células epiteliais respiratórias^(19,29,31) e/ou macrófagos alveolares^(19,40,41). Após a internalização, a bactéria adapta-se as condições do meio intracelular da célula hospedeira (ex. defesas imunitárias, competição de recursos), replicando-se e estabelecendo uma população bacteriana fenotípica heterogénea, incluindo o fenótipo *Small Colony Variants (SCV)*. Esta subpopulação bacteriana exhibe uma atividade metabólica diminuída e uma expressão reduzida de importantes fatores de virulência (ex. α -toxina), evitando a ativação da resposta imunitária do hospedeiro e a ação dos antibióticos. Isto permiti-lhe persistir no meio intracelular das células hospedeiras morfológicamente íntegras durante extensos períodos de tempo^(2,29,42). *SASCV* tem a capacidade de escapar do meio intracelular da célula hospedeira e reverter as características fenotípicas da estirpe parental, podendo ser foco para um novo episódio agudo de infecção⁽²⁾. Assim, constituindo um reservatório de infeções crónicas e refratárias a terapêutica antimicrobiana⁽⁴³⁾.

Adesão e invasão das células hospedeiras

SASCV apresenta uma melhor capacidade em aderir e invadir as células do hospedeiro em comparação com *S. aureus* de fenótipo normal⁽³¹⁾. Isto pode ser explicado por vários fatores: primeiro, esta variante apresenta uma expressão aumentada das proteínas de ligação à fibronectina da bactéria e do receptor $\alpha_5\beta_1$ -Integrina localizada na superfície das células eucarióticas; segundo, como anteriormente mencionado esta variante provoca menos danos as células do hospedeiro e por último, este fenótipo são mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro do meio intracelular⁽³¹⁾.

Em 2011, Mitchell e colaboradores desenvolveram um modelo de infecção de *S. aureus* de células epiteliais respiratórias polarizadas *non-CF* e *CF-like* com o objetivo de comparar a infecção por *S. aureus* e *SASCV* em ambos modelos. Os autores observaram

que as estirpes de *S. aureus* e *SASCV* eram mais facilmente internalizadas nas células epiteliais *CF-like* do que nas células epiteliais normais. Segundo os resultados deste estudo a disfunção de CFTR facilita o desenvolvimento de infecções intracelulares por *S. aureus*, podendo induzir a formação de SCV no meio intracelular e portanto, promovendo a persistência de *S. aureus* nas vias aéreas dos doentes com FQ⁽³¹⁾.

Auxotrofismo

SASCV caracteriza-se pelo crescimento de colónias de dimensões reduzidas, não pigmentadas e não hemolíticas⁽²⁴⁾ que tem a habilidade de reverter as características fenotípicas da estirpe parental aquando suplementação com diferentes substratos apropriados⁽²⁴⁾. Vários isolados clínicos de *SASCV* em doentes com FQ (Tabela 1 em anexo) demonstraram auxotrofia para menadiona, hemina, timidina, CO₂ e ácidos gordos^(23,44). No entanto, também tem sido descritos isolados clínicos *SASCV* sem auxotrofismo subjacente identificado⁽²³⁾.

Apesar destas estirpes apresentarem uma taxa de crescimento reduzida e características morfológicas similares, os mecanismos de formação deste fenótipo envolvem múltiplas vias metabólicas^(2,45). Até a data, só tem sido identificadas as alterações responsáveis pela formação de *SCV dependente de Hemina* (Hem-SCV), *SCV dependente de Menadiona* (Men-SCV) e *SCV dependente de timidina* (TD-SCV)⁽²⁾:

Hem-SCV e **Men-SCV** exibem defeitos genéticos ou funcionais nas vias da biossíntese de citocromos, afetando a cadeia transportadora de eletrões⁽²⁾. Estas variantes podem ser selecionadas pela exposição de aminoglicosídeos e pela coinfeção com *P. aeruginosa*^(2,44). Estas alterações conduzem a uma redução do potencial de membrana das células levando a diminuição da entrada do antibiótico na célula⁽⁴⁴⁾.

Estudos *in vitro* demonstraram que as exotoxinas HQNO (*4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide*) e piocianina produzidas pela bactéria *P. aeruginosa*, induzem a seleção de *SASCV*. No entanto, só alguns estudos clínicos apontaram uma associação entre a presença de *SASCV* e coinfeção com *P. aeruginosa*^(24,28,46,47). Na FQ, esquemas com aminoglicosídeos são utilizados no tratamento das infecções respiratórias por *P. aeruginosa*⁽²⁾. Assim, *P. aeruginosa* promove a sobrevivência de *S. aureus* nas condições hostis das vias aéreas da FQ, pela indução de *SCV*⁽⁴⁸⁾.

O isolamento de **TD- SCV** é um achado comum nas amostras respiratórias de doentes com FQ. Esta variante é selecionada pela exposição a curto e longo-prazo de Sulfametoxazol-trimetoprim⁽⁴⁹⁾, o qual é um dos antibióticos mais frequentemente utilizados nas infeções respiratórias por *S. aureus* e por *MRSA* dos doentes com FQ^(23,50). Este antibiótico atua inibindo a síntese ácido tetrahidrofólico, que funciona como cofator da timidilato-sintase, uma proteína essencial necessária para a conversão de timidina a partir de uracilo^(2,44). Esta variante sobrevive da timidina externa, a qual esta presente em grandes quantidades nas secreções brônquicas purulentas dos doentes com FQ^(2,51).

Resistência a antibióticos

Este fenótipo apresenta diversas estratégias que se estendem para além dos mecanismos clássicos de resistência antimicrobiana de *S. aureus*⁽⁵²⁾, exibindo maior resistência a classes específicas de antibióticos do que a sua estirpe parental^(53,54). A persistência intracelular mostrada por esta variante protege-a da ação de várias classes de antibióticos⁽²⁾. Por outro lado, existe uma associação entre exposição a antimicrobianos e a seleção de *SASCV*, como exemplificado no isolamento das variantes TD-SCV, Hem-SCV e TD-SCV^(2,54,55). Estudos *in vitro* descreveram a seleção do fenótipo *SASCV* após exposição a antibióticos como: vancomicina, ácido fusídico, quinolonas e triclosan^(44,56).

Num estudo multicêntrico randomizado de seis meses, Green e colaboradores estudaram a associação entre o tratamento com azitromicina e a emergência de *SASCV* em 260 crianças e adolescentes com FQ infetados por *S. aureus*. Durante este período, investigadores detetaram um aumento de estirpes *S. aureus* resistentes a azitromicina que contudo não estavam associadas a emergência de *SASCV*⁽⁵⁷⁾.

Até a data, não existe recomendações nem evidência sobre o tratamento ótimo para as infeções causadas por *SASCV*⁽²⁾.

Diagnóstico Microbiológico

As características especiais das vias aéreas da FQ tornam o seu diagnóstico microbiológico num processo complexo e oneroso^(2,58), requerendo procedimentos particulares na preparação e processamento das amostras respiratórias, o uso de múltiplos meios de culturas e a aplicação de métodos de tipagem moleculares para a identificação com sucesso dos principais microrganismos patogénicos da FQ^(58,59). Várias recomendações têm sido desenvolvidas neste contexto, sublinhando o importante papel desempenhado pelo microbiologista clínico:

- no reconhecimento dos diversos microrganismos patogénicos da FQ e na notificação da presença de fenótipos atípicos e de estirpes multirresistentes;
- na orientação e monitorização terapêutica das infeções respiratórias (tabela 2 em anexo);
- no fornecimento de dados fidedignos para vigilância e estudo epidemiológico^(58,60-62).

No exame microbiológico das secreções respiratórias de doentes com FQ são reconhecidas três variantes morfo-fenotípicas de *S. aureus*: normal ou não mucoide, SCV e mucoide⁽⁶⁰⁾. As *guidelines* atuais descrevem os procedimentos apropriados para a deteção e identificação do fenótipo normal, indicando a utilização dos meios seletivos para cultura de *S. aureus*, tais como: agar manitol salgado (MSA), agar cromogénico e agar Columbia/ ácido nalidíxico e colistina^(12,60,62). A aplicação destes meios facilitam o crescimento e identificação desta bactéria em culturas das amostras respiratórias polimicrobianas da FQ, impossibilitando o crescimento de outros microrganismos da flora comensal, particularmente de *P. aeruginosa*^(58,63).

Quanto ao diagnóstico microbiológico de SASCV, esta variante fenotípica exhibe características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas distintas ao do fenótipo normal dificultando o seu isolamento, identificação e determinação da suscetibilidade antibiótica segundo os procedimentos de rotina aplicados no laboratório de FQ, os quais dependem destas características⁽²⁾.

SASCV exhibe uma taxa de crescimento seis-vezes reduzida ao do fenótipo normal, resultando na formação de colónias de pequenas dimensões (de 0,2 mm de diâmetro) que apenas são visíveis após um período de incubação prolongado entre 48-72 horas,

ocorrendo o risco de passar despercebida ou ocultada pelo crescimento excessivo da estirpe parental e da flora comensal^(2,51,54,64). Em meios de cultura convencionais, esta variante fenotípica cresce sob a forma de colónias pequenas, de aspeto puntiforme ou em “fried-egg” (Figura 1), não pigmentadas e não hemolíticas, podendo ser incorretamente identificadas por outras bactérias da flora do trato respiratório (ex. *Streptococcus não hemolítico*, *Haemophilus*)^(2,26,54). Além disto, as estirpes *SASCV* caracterizam-se pela sua habilidade de reverter de forma “súbita e espontânea” às características fenotípicas da estirpe parental, dificultando ainda mais a sua identificação durante a cultura^(2,23).

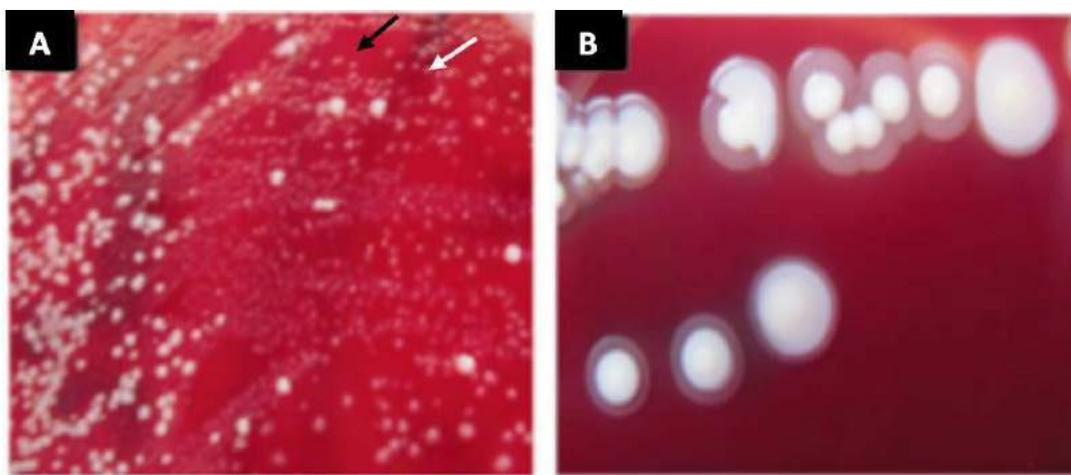


Figura 1. Crescimento de colónias mistas de *S. aureus* (seta preta) e *SASCV* (seta branca) de secreções respiratórias de doentes com FQ. Adaptado de Kahl, BC *et al.*, (2016) e O’Melter *et al.*, (2010)^(2,54). **A-** Agar de sangue; **B-** Colónias de *SASCV* com aspeto em “fried-egg”.

Durante décadas, vários trabalhos vieram abordar os métodos utilizados para o isolamento, identificação e caracterização de *SASCV* nas amostras respiratórias de doentes com FQ⁽²⁾. Os métodos de cultura empregados nestes estudos clínicos encontram-se resumidas na Tabela 1 em anexo. Apesar das diferenças observadas entre os métodos de cultura empregados nestes estudos, investigadores sublinham dois pré-requisitos importantes para o isolamento e identificação com sucesso de *SASCV*^(2,32):

1. a pesquisa ativa de *SASCV*, através da inspeção meticulosa de culturas e o reconhecimento das suas características fenotípicas (Tabela 3);
2. a implementação de extensos meios de cultura em condições de cultivo adequadas complementadas com o uso de técnicas de identificação moleculares.

Tabela 3. Características fenotípicas de *S. aureus* e *SASCV*. Adaptada de Von Eiff *et al.*, (2007) e Kahl *et al.*, (2016)^(2,52).

Características da colônia	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus SCV</i>
Tamanho da colônia após 24 h de incubação	1 – 3 mm	Não visíveis ou microcolônias com 1/10 do tamanho do fenótipo normal
Pigmentação	Dourado	ausente ou reduzida
Hemólise em agar de sangue	Área fraca ou forte de β -hemólise	ausente ou reduzida
Crescimento em meio sólido	Colônias visíveis em 12-24 h	Colônias visíveis em 48 -72 h
Prova de coagulase	normal	reduzida (> 18 h de incubação)
Prova de catalase	normal	reduzida
Auxotrofia	nenhuma	Hemina, menadiona, timidina, CO ₂ e ácidos gordos

Escolha das amostras respiratórias para cultura de SCV de *S. aureus*

O isolamento de estirpes *SASCV* tem sido reportada em amostras respiratórias de lavado bronco-alveolar, expetoração e de secreções orofaríngeas profundas, escolhidas conforme o contexto clínico do indivíduo. O *Gold-standard* é o lavado bronco-alveolar mostrando maior acurácia diagnóstica, contudo esta apresenta desvantagens quanto a sua obtenção e colheita, sendo deferida por outros tipos de amostras mais práticas⁽⁶⁵⁾.

A cultura de expetoração constitui a amostra de rotina na prática clínica, contudo esta não é usualmente aplicável em crianças pequenas ou doentes incapazes de produzir expetoração, recorrendo-se nestes casos a obtenção de secreções orofaríngeas profundas⁽¹³⁾. Esta última, apesar de não ser considerada um bom preditor das infeções das vias respiratórias baixas^(34,46,66), permite o crescimento de *SASCV* se cultivadas em condições de cultura ótimas e apropriadas⁽²⁾.

Meios de Cultura

Vários meios de cultura têm sido avaliados com o objetivo de identificar os meios mais sensíveis para o isolamento e identificação de *SASCV* nas amostras respiratórias polimicrobianas dos doentes com FQ.

Um dos primeiros meios de cultura sugeridos foi o agar manitol salgado (MSA). Sparham e colaboradores conduziram um estudo de sete meses, nos quais visaram estudar os métodos mais apropriados para o processamento e isolamento de *S. aureus* em 60

amostras de escarro de 14 doentes com FQ. Na utilização deste meio, os autores verificaram um aumento de isolamentos de *S. aureus* e ainda identificaram a variante *SCV dependente de timidina* (TD-SCV) nas amostras respiratórias de sete doentes. Os espécimes TD-SCV inoculados em MSA requereram um período de incubação de dois dias, descrevendo-se o crescimento de colónias com morfologia “bizarra”^(2,63). Em 1987, Gilligan e colegas corroboraram estes achados ao examinar a habilidade de crescimento de 15 estirpes TD-SCV em nove meios de culturas utilizados rotineiramente pelo laboratório de FQ para a identificação de *S. aureus*, sugerindo o uso de MSA como o meio de escolha para a deteção e identificação de TD-SCV⁽²⁶⁾. Na utilização deste meio de cultura, recomenda-se o uso acompanhado de um meio geral (ex. agar de sangue)⁽²⁾, dado que esta variante fenotípica frequentemente não fermenta manitol, podendo não ocorrer desenvolvimento de colónias ou formando colónias atípicas cor-de-rosa^(2,67).

Em 2005, Kipp e colaboradores avaliaram a sensibilidade do crescimento de 53 isolados de *S. aureus* e de *SASCV* em dois novos ágaes cromogénicos em comparação com os meios MSA, agar Baird-Parker (BPA), *Tryptic Soy agar* (TSA) e agar Columbia sangue (Tabela 4). Os autores concluíram que o método mais rápido e seguro para identificação e deteção de *S. aureus* e de *SASCV* consistia na inoculação paralela das amostras em agar Columbia sangue (CBA) e agar *S. aureus* ID (SAID). O agar Columbia sangue permitia a deteção do fenótipo *SCV*, enquanto o uso de SAID confirmava que o espécime *SCV* isolado correspondia a espécie *S. aureus*. As estirpes de *SASCV* inoculadas em agar cromogénico (Figura 2) não exibiam mudança de cor, tal como ocorre no fenótipo normal, facilitando o seu reconhecimento⁽⁶⁸⁾.

Tabela 1. Percentagem de sensibilidade de meios de cultura para o crescimento do fenótipo *SASCV*, adaptada de Kipp *et al.*, (2005) ⁽⁶⁸⁾.

Meios de cultura	SASCV		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>S. aureus</i> ID agar (SAID)	92 %	98 %	98 %
CHROMagar <i>Staph aureus</i> (CHRA)	49 %	89 %	94 %
Agar manitol salgado (MSA)	66 %	89 %	94%
Baird-Parker agar (BPA)	85 %	96 %	98 %
<i>Tryptic soy agar</i> (TSA)	74 %	85 %	91 %
Agar Columbia de sangue (CBA)	97 %	100 %	100 %

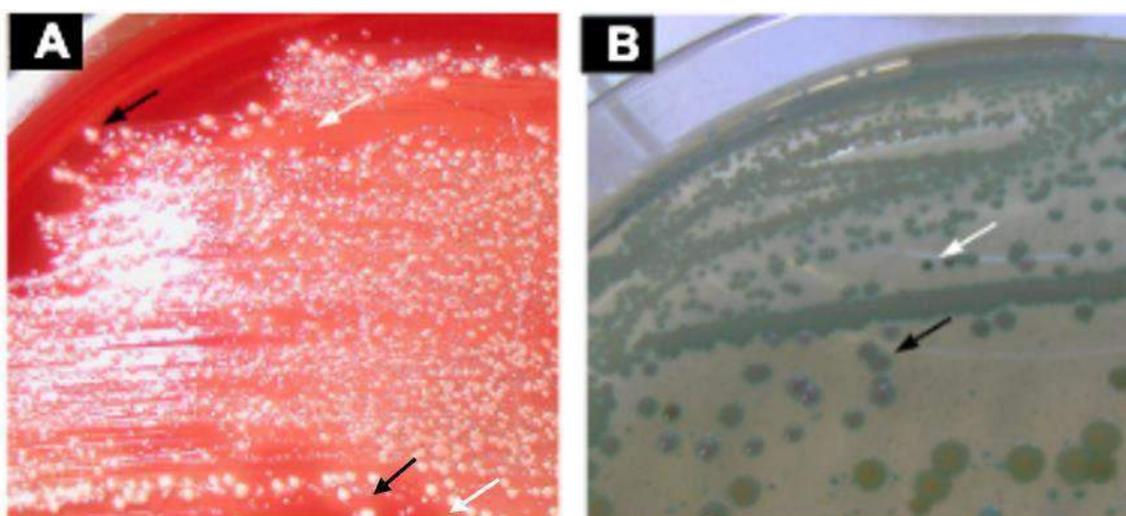


Figura 2. Crescimento em cultura de colónias mistas de *S. aureus* (setas pretas) e *SASCV* (setas brancas) de secreções respiratórias de doentes com FQ. Adaptado de Kahl, BC *et al.*, (2016) e O'Melter *et al.*, (2010) ^(2,54). **A-** Agar Columbia de sangue; **B-** Agar cromogénico SAID.

Noutro estudo realizado num Centro de FQ turco, Yagci e colaboradores visaram identificar o melhor método de cultura para a deteção de *SASCV* em amostras respiratórias analisadas de um grupo de doentes. Os autores concluíram que a inoculação de espécimes nos meios MSA, *Brain-heart infusion agar* (BHIA) suplementado com 5% NaCl e agar Columbia, fornecia os melhores resultados. Só o uso combinado de MSA e BHIA com 5% NaCl proporcionava uma taxa de deteção de 86,6% dos isolamentos de *SASCV*, tendo sido proposto o uso desta combinação em laboratórios clínicos de FQ com recursos limitados⁽²⁸⁾.

Na identificação de estirpes *SASCV*, vários estudos descreveram a utilidade da subcultura paralela de colónias com morfologia sugestiva de *SASCV* em agar de sangue (ou agar Columbia) e um meio enriquecido como agar Schaedler (ou agar chocolate, Brucella). A presença de “*microcolónias*” em agar de sangue e a subsequente reversão das estirpes inoculadas em agar Schaedler às características fenotípicas da estirpe parental eram assinaladas suspeitas, procedendo-se a execução dos métodos de confirmação da espécie^(22,27,28,32,65,67).

Métodos de Confirmação da espécie

As provas bioquímicas (ex. coagulase e catalase) e os sistemas automatizados (ex. *Api ID 32 Staph*, *VITEK*, *bioMeriéux*) constituem métodos não fiáveis na identificação de *SASCV*, dado ao crescimento lento e atividade metabólica reduzida desta variante, proporcionando resultados erróneos, ambíguos e falsos-negativos^(51,54,69).

A aplicação de técnicas moleculares como a técnica de PCR dos genes *nuc*, *coa*, *spa* e a sequenciação de 16S rRNA, constituem métodos alternativos mais específicos, rápidos e adequados para a identificação deste fenótipo, contudo não são técnicas rotineiramente utilizadas em laboratórios clínicos de FQ^(2,65). Outra opção sugerida é a técnica MALDI-TOF MS, descrita como uma técnica vantajosa⁽⁷⁰⁾ e segura⁽²⁾ na identificação de *SASCV* e a qual têm sido empregada em vários estudos de séries de doentes com FQ^(16,22,50,71).

Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de resistência antimicrobiano das estirpes *SASCV* não pode ser assumido como semelhante ao da sua estirpe parental⁽⁷²⁾, demonstrando a importância da avaliação da suscetibilidade antimicrobiana desta variante fenotípica, em termos das potenciais implicações na tomada de decisão terapêutica.

A avaliação da suscetibilidade antibiótica de *SASCV* constitui um desafio, dada a sua difícil execução e interpretação pelos métodos habituais (sistemas automatizados, métodos de microdiluição e de difusão), desenvolvidos e testados em estirpes bacterianas de crescimento rápido^(2,51,54). Os meios de cultura standardizados (ex. agar Mueller-Hinton) para a execução de métodos de microdiluição e de difusão não suportam o crescimento desta variante^(26,72,73), não existindo até a data nenhum meio de cultura apropriado e validado⁽⁷⁴⁾.

Num estudo multicêntrico recente realizado pelo grupo de trabalho do Comité do Instituto de Referências Clínicas e Laboratoriais (CLSI), avaliaram a acurácia dos métodos de difusão de disco com cefoxitina e do teste de deteção da proteína PBP2a em 37 espécimes atípicos de *S. aureus*, tendo como método de referência a técnica PCR do gene *mecA*. Miller e colaboradores relataram uma baixa correlação entre os resultados do teste de difusão de disco com cefoxitina e do teste de PCR do gene *mecA*, desaconselhando a utilização do primeiro método dado ao elevado risco de resultados de falsa suscetibilidade antibiótica. Como resultado deste estudo, a técnica PCR do gene *mecA* e teste de deteção

da proteína PBP2a^a constituem os únicos métodos recomendados pelo CLSI na avaliação da suscetibilidade a meticilina dos isolados *S. aureus atípicos*^b(74). Ainda os autores sugeriram que isolamentos de *SASCV* em doentes com FQ fossem reportados como resistentes aos antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol e aminoglicosídeos⁽⁷⁴⁾.

A determinação da auxotrofia das estirpes de *SASCV* permite predizer de forma fidedigna a suscetibilidade de alguns antibióticos, tal como compreender os mecanismos subjacentes a sua formação^(2,72,74). Os ensaios de dependência para substratos de hemina, menadiona, timidina, ácidos gordos é determinada através do crescimento de colónias em discos standardizados (impregnados com estes substratos) em agar Mueller-Hinton (MHA) ou em meios de cultura suplementados. A dependência por CO₂ pode ser determinada pela criação de condições de cultura em atmosfera com 5% de CO₂, podendo recorrer-se a sistemas automáticos para a formação de um ambiente anaeróbio^(2,51,75).

A falta de métodos standardizados para a avaliação de suscetibilidade antibiótica para outros agentes antimicrobianos, levou a investigadores recorrerem a execução dos métodos de difusão e métodos de microdiluição em meios e condições de cultura adaptadas, não recomendadas nem validadas^(72,74). A avaliação da acurácia destes métodos em estudos multicêntricos⁽⁷⁴⁾, podem constituir uma das futuras opções na avaliação da suscetibilidade antibiótica de *SASCV*. Por outro lado, futuros estudos de sequenciação genómica podem fornecer informação relevante acerca da suscetibilidade antibiótica destas estirpes⁽⁷⁴⁾.

Diagnóstico de *SASCV* nos laboratórios clínicos de FQ: realidade e implicações diagnósticas

Durante décadas, vários trabalhos descreveram o isolamento e caracterização de *SASCV* nas amostras respiratórias dos doentes com FQ, sublinhando a importância no desenvolvimento e implementação de protocolos adaptados para o diagnóstico microbiológico de *SASCV* nos laboratórios clínicos da FQ.

Apesar do crescente interesse do ponto de vista microbiológico e clínico de *SASCV*, desconhece-se o número de laboratórios clínicos de FQ que pesquisem ou reportem esta

^a A utilização de uma quantidade de inóculo melhorava a taxa de deteção para 100% dos isolados *S. aureus atípicos*

^b Esta recomendação foi proposta na próxima 27^ª edição das *Guidelines standard M100s*.

variante fenotípica^(61,66). Em 2014, foram publicados dois estudos europeus de qualidade que examinaram os protocolos laboratoriais empregados nos laboratórios clínicos dos Centros especializados de FQ nacionais, mediante a realização de um questionário; e subsequentemente avaliaram a sua adesão as *guidelines* nacionais e internacionais publicadas, com o objetivo de desenvolver recomendações gerais para o processamento das amostras respiratórias de FQ^(59,76).

Hafner e colaboradores avaliaram os protocolos de 45 de 83 laboratórios alemães contactados, responsáveis pelo diagnóstico microbiológico de 56% da população com FQ alemã registada no ano 2010. Os investigadores observaram que a maioria dos laboratórios aplicavam as *guidelines* alemãs, contudo identificaram que só 21 laboratórios empregavam meios de culturas especiais para a deteção de *SASCV* e que apenas 70% dos investigadores reportavam a cultura desta variante fenotípica^(76,77).

Noutro estudo realizado em Espanha, Caballero e colegas examinaram os protocolos laboratoriais de 17 centros de FQ espanhóis, concluindo que a maioria dos laboratórios cumpriam as *guidelines* espanholas ou internacionais, no entanto realçaram a necessidade da melhoria de alguns procedimentos, nomeadamente no uso de meios de cultura seletivos e a implementação de métodos moleculares de tipagem. Os autores determinaram que apenas 59% dos laboratórios utilizavam meios de cultura seletivos para *S. aureus* e que apenas quatro Centros de FQ eram notificados da presença de estirpes *hipermutáveis*, *SCV* de *P. aeruginosa* e/ou de *S. aureus*⁽⁵⁹⁾.

Ambos estudos demonstraram que apesar de existir uma maior aderência e standardização das práticas laboratoriais pelos laboratórios clínicos segundo as *guidelines* publicadas, existem falhas na deteção e identificação de microrganismos emergentes e fenótipos atípicos, como o fenótipo *SCV*^(59,76). A formação contínua e o treino especializado de microbiologistas, a realização de avaliações externas de qualidade, o estabelecimento de laboratórios de referência e a realização de estudos de monitorização do impacto do processamento apropriado na prevalência dos microrganismos de FQ, constituem algumas das medidas propostas para melhoria do diagnóstico microbiológico, em resposta a crescente complexidade da área da microbiologia de FQ^(76,78).

Epidemiologia

Colonização-infecção pulmonar por *S. aureus*: Dados epidemiológicos de Registos nacionais de doentes

A implementação dos Registos nacionais de doentes com FQ facultaram instrumentos fulcrais para a vigilância e monitorização dos principais agentes patogénicos associados as infeções respiratórias na FQ^c e conseqüentemente estudo epidemiológico, possibilitando a avaliação do impacto das estratégias terapêuticas e a otimização na abordagem e tratamento da doença pulmonar⁽⁷⁹⁾.

As infeções respiratórias bacterianas da FQ exibem um padrão epidemiológico dependente da idade⁽²⁾: *S. aureus* é um dos primeiros microrganismos isolados nas secreções respiratórias dos doentes com FQ⁽³³⁾. Durante a infância e adolescência atinge sua prevalência máxima de cerca de 80%, vindo a diminuir na idade adulta na qual predomina a infeção por *P. aeruginosa*^(2,10). No entanto, cerca de 45% dos doentes adultos permanecem colonizados por *S. aureus*^(10,33).

A Sociedade Europeia de Fibrose Quística (ECFS) é o organismo responsável pela recolha de dados demográficos e clínicos de cerca de 48,000 doentes de 35 países, incluindo Portugal⁽⁸⁰⁾. Segundo o relatório anual de ECFS de 2017, reportou-se uma prevalência da infeção crónica por *S. aureus*^d variando entre 15,4% a 84,4%, estes valores registados no Reino Unido^e e Arménia, respetivamente ⁽⁸⁰⁾. O registo europeu não recolhe dados de isolamentos de MRSA, contudo estudos epidemiológicos europeus recentes reportaram uma prevalência de MRSA entre três a 13%⁽⁵⁵⁾.

Em Portugal, cerca 48% dos doentes estão colonizados cronicamente por *S. aureus*⁽⁸⁰⁾. Num estudo retrospectivo realizado no centro de FQ do Hospital de Santa Maria, foram avaliados a prevalência e incidência da colonização por MRSA em 60 doentes pediátricos durante um período de cinco anos (2003-2007). Durante o período de estudo, os autores

^c *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *complexo Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e Micobactérias atípicas.

^d Definida como a presença de >50% de culturas positivas, estas obtidas nos últimos 12 meses e num número mínimo de quatro amostras.

^e segundo o Relatório anual de ECFS de 2017, este país adota como definição de infeção crónica: a presença de pelos menos três ou mais amostras positivas do agente nos últimos 12 meses.

observaram uma subida da prevalência por MRSA de 7,3% em 2003 a 14,3% em 2007 e da sua incidência de 4,9% em 2003 a 8,9% em 2007⁽⁸¹⁾.

Segundo dados da Fundação Americana de Fibrose Quística (CFF) de 2018, 70% dos doentes registados apresentavam culturas positivas para *S. aureus*. A prevalência máxima por *Staphylococcus aureus* sensível a metilina (MSSA) ocorre nas crianças com idade inferior a 10 anos, enquanto a prevalência de MRSA atingiu um pico máximo de 30% dos doentes na faixa etária entre 10-30 anos de idade⁽¹⁰⁾ (Figura 3).

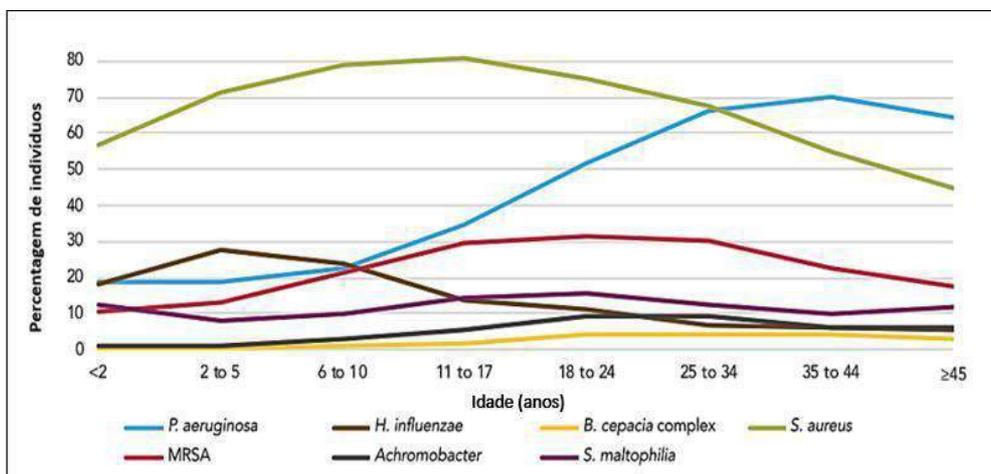


Figura 3. Prevalência dos microrganismos respiratórios em doentes com FQ específico da faixa etária, segundo o Relatório anual de CFF de 2018⁽¹⁰⁾.

Nas últimas duas décadas, verificou-se um aumento dramático da prevalência por MRSA de 6,1% em 2000 a 26% em 2015⁽⁸²⁾, explicada pela melhoria e standardização das práticas laboratoriais e práticas terapêuticas aplicadas. Recentemente, assistiu-se a uma estabilização da taxa de prevalência de MRSA reportando-se um valor de 25%, decorrente da implementação de campanhas de sensibilização e o reforço de medidas de prevenção e controle da infeção cruzada⁽¹⁰⁾ (Figura 4).

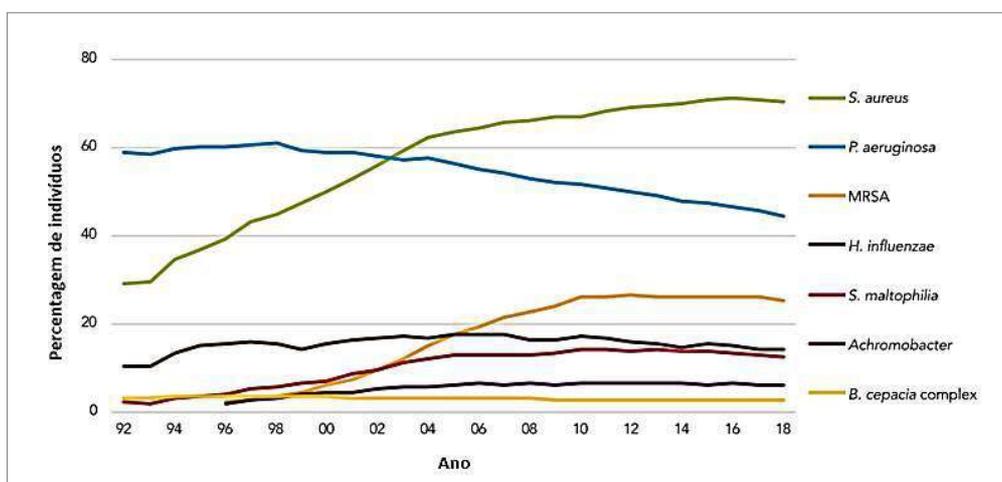


Figura 4. Prevalência dos microrganismos respiratórios em doentes com FQ nos E.U.A, durante o período de 1992-2018, segundo o Relatório anual de 2018 da CFF⁽¹⁰⁾.

Dados do relatório anual de 2017 do Registo Nacional de doentes com Fibrose Quística Australiano (ACFDR) reportou valores similares ao de alguns países europeus, com uma prevalência de *S. aureus* em 50,9 % de doentes e de MRSA em 4,6% doentes⁽⁸³⁾.

A variabilidade dos valores das taxas de prevalência da colonização-infeção por *S. aureus* e de MRSA, refletem as disparidades entre países em termos de: status socioeconómico, sistemas de saúde, a taxa de colonização-infeção de *S. aureus* na população geral e principalmente, das distintas práticas clínicas adotadas na prevenção, erradicação e tratamento da colonização-infeção por *S. aureus*^(79,84). Apesar destas discrepâncias, verificou-se um aumento da prevalência de *S. aureus*^(79,84), adjudicadas em parte ao aumento dos isolamentos de MRSA⁽⁸⁴⁾. O aumento significativo da prevalência da colonização-infeção por MRSA na população com FQ reflete a tendência global na população geral⁽⁵⁵⁾, mas também pode ser adjudicada ao aumento da sobrevivência média dos doentes e a exposição acumulativa dos esquemas de antibióticos utilizados⁽⁸¹⁾.

Por outro lado, a incidência e prevalência de *P. aeruginosa* tem vindo a diminuir^(79,84), explicada em parte pela implementação generalizada de esquemas de erradicação precoce desta bactéria⁽¹⁰⁾. Assim, *S. aureus* tornou-se no agente mais frequentemente isolado em doentes com FQ^(10,85), enfatizando a importância de definir o significado clínico desta bactéria na progressão da doença pulmonar da FQ, de forma desenvolver consensos sobre a sua abordagem e terapêutica.

Prevalência da Colonização-infeção pulmonar de *S. aureus* em doentes com FQ

As dificuldades acima descritas no diagnóstico de *SASCV* nas amostras respiratórias FQ pelos laboratórios clínicos, levam ao subdiagnóstico desta variante fenotípica e a avaliação precisa da prevalência da colonização das aéreas por *SASCV* nos doentes com FQ num desafio⁽⁵⁵⁾.

No período entre 1998-2020, foram publicados 14 estudos observacionais (Tabela 1 em anexo) cujo objetivo era determinar a prevalência da *SASCV* nas amostras respiratórias de doentes com FQ. Estes estudos foram realizados durante um período de estudo de entre 3 a 34 meses (média: 16 meses SD 11,2), envolvendo um número total de 3660 participantes provenientes de Centros especializados de FQ de nove países, incluindo: Reino Unido, Alemanha, Bélgica, Suíça, Áustria, Turquia, Itália, República Checa e Austrália(2). Estes estudos identificaram um número total de 330 doentes colonizados por *SASCV* com uma prevalência mediana global de 8%, e determinaram-se taxas de prevalência de colonização pulmonar de *SASCV* em doentes com FQ variando entre 0 - 33%.

Nos estudos indicados na Tabela 1 em anexo, verificou-se que as taxas de prevalência de *SASCV* reportadas variam substancialmente entre países. Vários fatores podem estar implicados, tais como: o desenho do estudo, a taxa de colonização por *S. aureus* em cada centro de FQ, as características clínicas do grupo de participantes (ex. idade), as diferentes técnicas de cultura utilizadas, a duração do período de estudo e finalmente, as distintas práticas clínicas e terapêuticas adotadas em cada país, tais como: a prevenção e controlo da infeção cruzada, o uso de esquemas de profilaxia anti-estafilocócica, os critérios de tratamento das infeções respiratórias e suas exacerbações, tal como os esquemas antimicrobianos empregados.

Implicações clínicas da colonização-infeção das vias aéreas por *SACV* de *S. aureus*

Ao menos cinco estudos clínicos tentaram investigar o significado clínico da presença de *SACV* nos doentes com FQ.

Num estudo prospetivo publicado em 2007, Besier e colaboradores foram os primeiros a correlacionar dados microbiológicos com os dados clínicos e epidemiológicos dos participantes. Os doentes portadores de *SACV* eram mais velhos, mais frequentemente co-infetados com *P. aeruginosa* e mostravam valores mais baixos de FEV₁. Pela aplicação um modelo de regressão logística, foram determinados como fatores de risco independentes para cultura positiva de *SACV*: baixo peso, idade avançada e o uso prévio de trimetoprim-sulfametoxazol^(2,24).

Com o mesmo objetivo, Schneider e colaboradores demonstraram que doentes colonizados por *SACV* eram significativamente mais velhos, estavam infetados durante mais tempo por *S. aureus*, apresentavam uma exposição prolongada a esquemas antimicrobianos (ex. aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol) e doença pulmonar avançada^(2,27).

Noutro estudo prospetivo unicêntrico, Wolter e colegas determinaram a prevalência, significado clínico e prováveis mecanismos de seleção *in vivo* de *SACV* num grupo de 100 crianças com idade inferior a 16 anos, durante um período de dois anos. Foi determinada que 24% dos participantes estavam infetados por *SACV* e apresentavam um significativo declínio da função pulmonar durante o período de estudo. Modelos de regressão multivariável sugeriram que a variante *SACV* era provavelmente selecionada *in vivo* pelo tratamento com trimetoprim-sulfametoxazol e possivelmente pela coinfeção com *P. aeruginosa*⁽⁴⁶⁾.

Em 2016, Junge e colaboradores realizaram um estudo prospetivo observacional longitudinal multicêntrico que teve como objetivo determinar os fatores de risco associados a deterioração da função pulmonar de doentes com FQ colonizados cronicamente por *S. aureus* e com idade superior aos seis anos. Análises de modelos mistos lineares sugeriram que a presença de exacerbações pulmonares, portadores (não nasais) de *S. aureus*, coinfeção pulmonar com *S. maltophilia*, a presença de anticorpos antiestafilocócicos específicos de IgG, níveis elevados de IL-6 e a presença de *SACV* constituem fatores de risco independentes para o declínio da função pulmonar de doentes

com infecções respiratórias persistentes por *S. aureus*. Os autores ainda verificaram que os doentes portadores de *SASCV* eram significativamente velhos, provavelmente tratados com trimetoprim-sulfametoxazol, e mostravam valores mais baixos de FEV₁% em comparação aos doentes não colonizados por *SASCV*⁽⁸⁶⁾.

Wolter e colaboradores efetuaram um estudo longitudinal publicado em 2019, no qual determinaram a prevalência e significado clínico de *SASCV* e dos seus subtipos num grupo de crianças entre seis a 16 anos de idade, provenientes de cinco centros especializados de FQ. Durante o período de dois anos, foi determinada uma prevalência em 28% dos participantes, na qual a maioria das estirpes *SASCV* isoladas eram do tipo *TD-SCV*. Modelos de regressão logística identificaram associações entre os portadores de *SASCV* e doença pulmonar avançada, diminuição da função pulmonar e aumento do risco de exacerbações pulmonares. Ainda identificaram como fatores de risco para a presença de *SASCV*: a idade, o tratamento com dornase-alfa (antes da participação no estudo) e tratamento com sulfonamidas três meses antes da deteção de *SASCV*⁽²³⁾.

Apesar das associações clínicas sugeridas nestes estudos clínicos ^(23,24,27,46,86), não é possível estabelecer uma correlação causal entre a presença de *SASCV* nas culturas das amostras respiratórias e o prognóstico dos doentes^(23,27,46). No entanto, estes estudos observacionais sugerem duas hipóteses: primeiro, a doença pulmonar avançada é um fator de risco para a emergência de *SASCV* ou segundo, que *SASCV* apresenta um papel patogénico significativo que contribui para o declínio da função pulmonar dos doentes com FQ^(2,23,27,46). O desenvolvimento de futuros estudos intervencionais direcionados para prevenção e tratamento de *SASCV*, podem elucidar estas questões^(23,46).

***MRSA-SCV* como reservatório natural de MRSA**

Vários estudos estabeleceram uma associação independente entre as infecções respiratórias persistentes por MRSA e pior prognóstico, com aumento da taxa de declínio da função pulmonar, aumento do número de hospitalizações e aumento da mortalidade dos doentes com FQ^(50,55). Esta associação tal como o aumento da sua prevalência nas últimas duas décadas tem obtido a atenção dos clínicos, dado que não existem protocolos de erradicação de MRSA recomendados, nem suficiente evidência sobre o impacto clínico dos esquemas de erradicação quer na colonização precoce e crónica^(55,87).

Atualmente, a implementação de medidas de prevenção e controle da infecção cruzada é considerada a melhor estratégia terapêutica^(10,55).

Estudos clínicos de prevalência de *SASCV* dos doentes com FQ publicados na última década^(22,23,28,46,47,50,67,71), reportaram uma percentagem significativa de isolamento de *MRSA-SCV* dos portadores de *SASCV* variando entre 11 a 57,1%.

Em 2018, Suwantarat e colaboradores caracterizaram a infecção *MRSA-SCV* na população pediátrica e adulta com o objetivo de identificar padrões únicos de suscetibilidade antibiótica. Os autores demonstraram que as estirpes de *MRSA-SCV* constituía uma proporção significativa⁽⁵⁰⁾ dos doentes cronicamente infetados por *MRSA*. Ainda observaram que doentes colonizados por *MRSA-SCV* apresentavam pior função pulmonar que os doentes só colonizados por *MRSA* e mais difíceis de tratar⁽⁵⁰⁾. Dado que maioria dos laboratórios clínicos não empregam métodos diagnósticos especiais para a deteção de *SASCV* e do subtipo *MRSA-SCV*⁽⁶⁶⁾, a colonização por *MRSA-SCV* representa um potencial reservatório não reconhecido de *MRSA* na população com FQ⁽⁸⁸⁾.

Conclusão

As estirpes *SCV* de *S. aureus* são frequentemente isolados nas secreções respiratórias dos doentes com FQ cronicamente colonizados por esta bactéria.

Esta variante fenotípica demonstra características fenotípicas e patogénicas que promovem a sua adaptação e persistência a longo-prazo nas vias aéreas dos doentes com FQ, constituindo uma estratégia de sobrevivência durante o processo de infeção por *S. aureus*.

Dadas a suas características morfológicas, fisiológicas e metabólicas distintas, o seu diagnóstico laboratorial constitui um desafio para o microbiologista clínico. Estudos de qualidade determinaram que a maioria dos laboratórios clínicos de FQ demonstram falhas no diagnóstico laboratorial de *SASCV*, não aplicando protocolos laboratoriais adaptados para sua pesquisa e identificação.

Estudos de prevalência da colonização bronco-pulmonar por *SCV S. aureus* indicaram uma associação entre os portadores de *SASCV* e a diminuição da função pulmonar.

O desenvolvimento de protocolos laboratoriais estandardizados pelos laboratórios clínicos com FQ, o treino especializado do microbiologista clínico na pesquisa e identificação de *SASCV*, podem facilitar o diagnóstico microbiológico desta variante fenotípica. A melhoria do diagnóstico laboratorial permitiria a obtenção de dados epidemiológicos mais fidedignos e a possibilidade de realizar estudos epidemiológicos e intervencionais que possam fornecer evidência mais sólida na investigação do papel patogénico e impacto clínico de *SCV* de *S. aureus* na doença pulmonar dos doentes com FQ.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, dirijo o meu agradecimento a Dr.^a Aida Pereira por ter aceitado o meu pedido de orientar a minha tese de mestrado e pelas suas sugestões apresentadas que me ajudaram na organização e elaboração deste trabalho.

Em segundo lugar, dirijo um agradecimento a Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, por ter aceitado a minha candidatura para a realização da minha tese de mestrado. Ao Hugo Caldeira, pela ajuda e disponibilidade de responder as minhas questões.

Por fim, queria agradecer a minha família, e em especial à minha irmã, pelo apoio e conselhos durante este processo.

Bibliografia

1. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020;8(1):65–124.
2. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Apr 9;29(2):401–27.
3. Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2015 Dec 14;1(1):15010.
4. Dorfman R, Crowdy E, Bear C, Corey M, Durie P, Ratjen F, et al. Cystic Fibrosis Mutation database [Internet]. Cystic Fibrosis Mutation Database. 2008. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
5. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of pseudomonas aeruginosa to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2013. p. 91–118.
6. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: A mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.* 2012 Apr 5;18(4):509–19.
7. Damas C, Amorim A, Gomes I, Hespanhol VP. Fibrose quística: Revisão. *Rev Port Pneumol (English Ed.* 2008 Jan;14(1):89–112.
8. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016 Nov;388(10059):2519–31.
9. Charman S, McClenaghan E, Cosgriff R, Lee A, Carr S. UK Cystic Fibrosis Registry Annual data report 2018. 2018;(August).
10. Cystic Fibrosis Foundation, Fibrosis Foundation C. 2018 Patient Registry Annual Data Report. *Lung.* 2019;
11. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373(9678):1891–904.
12. Döring G, Hoiby N, Assael B, Ballmann M, Bush A, Button B, et al. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros.* 2004;3(2):67–91.
13. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):29–

- 70.
14. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J Cyst Fibros*. 2012 Dec;11(6):461–79.
 15. Direção Geral da Saúde. Tratamento e Seguimento da Fibrose Quística em Idade Pediátrica e no Adulto. 2014;2–4. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0322012-de-28122012-png.aspx>
 16. Tkadlec J, Vařeková E, Pantůček R, Doškař J, Růžicková V, Botka T, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Czech Cystic Fibrosis Patients: High Rate of Ribosomal Mutation Conferring Resistance to MLS(B) Antibiotics as a Result of Long-Term and Low-Dose Azithromycin Treatment. *Microb Drug Resist*. 2015 Aug 1;21(4):416–23.
 17. Hoffman L. Epidemiology and outcomes of *Staphylococcus aureus* infection in CF. *Pediatr Pulmonol*. 2015 Oct;50(S41):S144.
 18. Schwerdt M, Neumann C, Schwartbeck B, Kampmeier S, Herzog S, Görlich D, et al. *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *Int J Med Microbiol*. 2018 Aug 1;308(6):631–9.
 19. Goerke C, Wolz C. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*. 2010 Dec;300(8):520–5.
 20. Hirschhausen N, Block D, Bianconi I, Bragonzi A, Birtel J, Lee JC, et al. Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol*. 2013 Dec;303(8):685–92.
 21. Kahl BC. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the hostile milieu of the CF airways. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(S12.1):S86.
 22. Masoud-Landgraf L, Zarfel G, Kaschnigg T, Friedl S, Feierl G, Wagner-Eibel U, et al. Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. *Curr Microbiol*. 2016 May 28;72(5):606–11.
 23. Wolter DJ, Onchiri FM, Emerson J, Precit MR, Lee M, McNamara S, et al. Prevalence and clinical associations of *Staphylococcus aureus* small-colony variant respiratory infection in children with cystic fibrosis (SCVSA): a

- multicentre, observational study. *Lancet Respir Med*. 2019 Dec 1;7(12):1027–38.
24. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan 1;45(1):168–72.
 25. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Apr;4(4):295–305.
 26. Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1987 Jul;25(7):1258–61.
 27. Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2008 May 1;46(5):1832–4.
 28. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Jan;19(1):77–84.
 29. Palma Medina LM, Becker A-KK, Michalik S, Yedavally H, Raineri EJM, Hildebrandt P, et al. Metabolic Cross-talk Between Human Bronchial Epithelial Cells and Internalized *Staphylococcus aureus* as a Driver for Infection. *Mol Cell Proteomics*. 2019 May;18(5):892–908.
 30. Riquelme SA, Wong Fok Lung T, Prince A. Pulmonary Pathogens Adapt to Immune Signaling Metabolites in the Airway. *Front Immunol*. 2020;11(March):1–14.
 31. Mitchell G, Grondin G, Bilodeau G, Cantin AM, Malouin F. Infection of polarized airway epithelial cells by normal and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF- κ B. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3541–51.
 32. Kahl B, Herrmann M, Everding ASS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus*

- in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis.* 1998;177(4):1023–9.
33. Kahl BC. Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(8):514–9.
 34. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep 1;41(9):4424–7.
 35. Armbruster CR, Coenye T, Touqui L, Bomberger JM. Interplay between host-microbe and microbe-microbe interactions in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2020;19:S47–53.
 36. Tuchscher L, Bischoff M, Lattar SM, Noto Llana M, Pfortner H, Niemann S, et al. Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog.* 2015;11(4):e1004870.
 37. Zhou K, Li C, Chen D, Pan Y, Tao Y, Qu W, et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2018 Nov;13:7333–47.
 38. Horn J, Stelzner K, Rudel T, Fraunholz M. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *Int J Med Microbiol.* 2018;308(6):607–24.
 39. Alexander EHH, Hudson MCC. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Aug 1;56(3–4):361–6.
 40. Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* Survives in Cystic Fibrosis Macrophages, Forming a Reservoir for Chronic Pneumonia. *Infect Immun.* 2017;85(5).
 41. Azad B. Investigation of the growth and survival of *Staphylococcus aureus* in CFTR-deficient macrophages. *Electron Thesis Diss Repos [Internet].* 2020 Jun 16 [cited 2020 Aug 2]; Available from: <https://ir.lib.uwo.ca/etd/7071>
 42. Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis.* 2010 Oct 1;202(7):1031–40.

43. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med.* 2011;3(3):129–41.
44. Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*--a bacterial survival strategy. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan;21:515–22.
45. Tuchscher L, Löffler B, Proctor RA. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Front Microbiol.* 2020;11(May):1–10.
46. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis.* 2013 Aug 1;57(3):384–91.
47. Morelli P, De Alessandri A, Manno G, Marchese A, Bassi M, Lobello R, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* small colony variant strains isolated from Italian patients attending a regional cystic fibrosis care centre. *New Microbiol.* 2015 Apr;38(2):235–43.
48. Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(APR):106.
49. Kriegeskorte A, Lorè NI, Bragonzi A, Riva C, Kelkenberg M, Becker K, et al. Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and Have Increased Fitness during SXT Challenge. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7265–72.
50. Suwantararat N, Rubin M, Bryan L, Tekle T, Boyle MP, Carroll KC, et al. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018 Apr 1;90(4):296–9.
51. de Souza DC, Lúcia Cogo L, Rosário Filho NA. Colônias variantes pequenas de *Staphylococcus aureus*: um novo alvo em Fibrose Cística. *Rev Panam Infectol.* 2016;18(1):39–45.

52. von Eiff C, Becker K. Small-colony variants (SCVs) of staphylococci: a role in foreign body-associated infections. *Int J Artif Organs*. 2007 Sep 10;30(9):778–85.
53. Thompson KM, Jefferson KK. Adaptation to Stress: Biofilms and Small-Colony Variants. *Staphylococci Hum Dis Second Ed*. 2009;109–24.
54. Melter O, Radojevič B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010 Nov 21;55(6):548–58.
55. Akil N, Muhlebach MS. Biology and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Nov 1;53(S3):S64–74.
56. Bui LMG, Conlon BP, Kidd SP. Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*. Venter H, editor. *Essays Biochem*. 2017 Mar 28;61(1):71–9.
57. Green N, Burns JL, Mayer-Hamblett N, Kloster M, Lands LC, Anstead M, et al. Lack of association of small-colony-variant *Staphylococcus aureus* strains with long-term use of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2772–3.
58. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Feb;27(2):89–104.
59. Caballero J de D, del Campo R, Tato M, Gómez G de la Pedrosa E, Cobo M, López-Causapé C, et al. Microbiological diagnostic procedures for respiratory cystic fibrosis samples in Spain: towards standard of care practices. *BMC Microbiol*. 2014 Dec 24;14(1):335.
60. Saiman L, Siegel J. Infection Control Recommendations for Patients With Cystic Fibrosis: Microbiology, Important Pathogens, and Infection Control Practices to Prevent Patient-to-Patient Transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 May 2;24(S5):S6–52.
61. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ, Brown RF, Bryson EA, Chambers MJ, et al. Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Aug 10;35(S1):s1–67.
62. UK Cystic Fibrosis Trust. Laboratory standards for processing microbiological

- samples from people with cystic fibrosis. 2010;(September 2010).
63. Sparham PD, Lobban DI, Speller DCE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sputum in cystic fibrosis. *J Clin Pathol*. 1978 Oct 1;31(10):913–8.
 64. von Eiff C. *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Jun;31(6):507–10.
 65. Burns JL, Rolain J-M. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? *J Cyst Fibros*. 2014 Jan;13(1):1–9.
 66. Carzino R, Hart E, Sutton P, King L, Ranganathan S, AREST CF. Lack of small colony variants of *Staphylococcus aureus* from lower respiratory tract specimens. *Pediatr Pulmonol*. 2017 May 1;52(5):632–5.
 67. Pakasticali N, Kaya G, Senel U, Kipritci O, Tamay Z, Guler N, et al. Prevalence, antibiotic and Pulsed-Field gel electrophoresis patterns of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2016 May 2;47(3):475–84.
 68. Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr 1;43(4):1956–9.
 69. Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, et al. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov 1;42(11):4988–95.
 70. Ota Y, Matsumoto T, Sugano M, Honda T. [Identification of Clinical Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry]. *Rinsho Byori*. 2015 Jun;63(6):683-87.
 71. Dodémont M, Argudín MA, Willekens J, Vanderhelst E, Pierard D, Miendje Deyi VY, et al. Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. *J Cyst Fibros*. 2019 Jan 1;18(1):86–93.
 72. Precit MR, Wolter DJ, Griffith A, Emerson J, Burns JL, Hoffman LR. Optimized In Vitro Antibiotic Susceptibility Testing Method for Small-Colony Variant

- Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan 4;60(3):1725–35.
73. Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, et al. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May 1;59(5):893–9.
 74. Miller SA, Karichu J, Kohner P, Cole N, Hindler JA, Patel R, et al. Multicenter Evaluation of a Modified Cefoxitin Disk Diffusion Method and PBP2a Testing To Predict *mecA*-Mediated Oxacillin Resistance in Atypical *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):485–94.
 75. Delgado-Valverde M, Fernández-Echauri P, Batista-Díaz N, Pascual-Hernández A. [Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: Usefulness of various test for diagnosis and susceptibility study]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Feb;32(2):96–8.
 76. Häfner L, Peters G, Kahl BC, Hafner L, Peters G, Kahl BC. Assessment of Microbiological Diagnostic Procedures for Respiratory Specimens from Cystic Fibrosis Patients in German Laboratories by Use of a Questionnaire. *J Clin Microbiol*. 2014 Mar 1;52(3):977–9.
 77. L. Häfner BK. Preliminary results of a questionnaire to assess the quality of the microbiological diagnostic of airway specimens from CF patients in German laboratories. *Int J Med Microbiol*. 2012 Sep;302(1):3–155.
 78. Hogardt M, Ulrich J, Riehn-Kopp H, Tümmler B. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3435–8.
 79. Hatziagorou E, Orenti A, Drevinek P, Kashirskaya N, Mei-Zahav M, De Boeck K, et al. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis—data from the European cystic fibrosis society patient registry. *J Cyst Fibros*. 2019 Sep;
 80. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L van RJ et al. ECFSPR Annual Report 2017. 2019.
 81. Fermeiro J, Reis P, Castanhinha S, Pereira L, Barreto C. Colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina: Que impacto na morbidade de

- doentes pediátricos com fibrose quística? *Rev Port Pneumol*. 2010;16(4):527–42.
82. Marshall, B.; Elbert, A.; Petren, K.; Rizvi, S.; Fink, A.; Ostrenga J. et al. Patient Registry: Annual Data Report 2015. Cyst Fibros Found Patient Regist [Internet]. 2016;94. Available from: <https://www.cff.org/Our-Research/CF-Patient-Registry/2015-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>
83. Ruseckaite, R; Ahern, S; Ranger, T; Dean, J; Gardam, M; Bell S et al. on behalf of the ACFDR. The Australian Cystic Fibrosis Data Registry Annual Report, 2017. 2019; Available from: https://www.cysticfibrosis.org.au/getmedia/24e94d66-29fa-4e3f-8e65-21ee24ed2e5a/ACFDR-2017-Annual-Report_highres_singles.pdf.aspx
84. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, et al. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest*. 2016;149(2):390–400.
85. Canada CF. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2018 Annual Data Report. 2018; Available from: <https://www.cysticfibrosis.ca/uploads/RegistryReport2018/2018RegistryAnnualDataReport.pdf>
86. Junge S, Görlich D, den Reijer M, Wiedemann B, Tümmler B, Ellemunter H, et al. Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166220.
87. Lo DKHK, Muhlebach MS, Smyth AR. Interventions for the eradication of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(7):CD009650.
88. Cleeve VJ, Perry JD, Cresswell G, Orr KE. Thymidine-dependent meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a potentially unrecognized reservoir of MRSA in hospital patients? *Journal of Hospital Infection*. 2006.

Anexos

Tabela 2. Estudos de prevalência de SASCV das secreções respiratórias de doentes com Fibrose Quística, publicados desde o ano 1998.

Autor, Ano, Referência	Tipo de estudo	Local de estudo	Período de estudo	Nº de doentes	Nº de doentes com <i>S. aureus</i>	Nº de doentes com SASCV (%)	Nº de doentes com MRSA-SCV(a) (%)	Auxotrofia ^(b)	Métodos empregados na identificação de SASCV
Kahl <i>et al.</i> , 1998 ⁽²⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Múnster, Alemanha	34 m (Abril 1994- Janeiro 1997)	78	53	26 (33%)	0	Hem (10), Hem (2), Thy (41), Thy + Hem (25)	BHI suplementado com 5% de NaCl, Agar Schaedler, Agar Columbia, Agar endo, Agar chocolate, PCR do gene <i>nuc</i> .
Besier <i>et al.</i> , 2007 ⁽³²⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Frankfurt, Alemanha	12 m (Janeiro 2004 - Dezembro 2004)	252	120	20 (8%)	-	Thy (15), Thy+Men (1), NI (8)	Agar de sangue, Agar de Chocolate, Agar endo, MSA, PCR do gene 16S rRNA e <i>mecA</i> .
Vergison <i>et al.</i> , 2007 ⁽²⁴⁾	Multicêntrico, observacional, prospetivo	Bélgica (9 centros)	7 m (Junho - Dezembro 2001)	627	275	25 (4.2%)	-	ND	TSA, MSA, Agar de sangue, Meio com colistina e aztreonam, PCR do gene 16S rRNA, <i>nuc</i> e <i>mecA</i>
Schneider <i>et al.</i> , 2008 ⁽⁷³⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Bern, Suíça	3 m	98	32	8 (8.2%)	-	ND	Agar Schaedler, MSA, Agar Columbia,

			(Julho - Outubro 2000)						Agar MacConkey.
Wolter <i>et al.</i> , 2013 ⁽²⁷⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Seattle, U.S.A	24 m (2008 - 2010)	100	88	24 (24%)	9 (37.5%)	Thy (95%), Hem (7%), Men (1%), CO ₂ (1%)	MSA, Agar de Sangue, Agar de Chocolate, Agar Brucella, PCR do gene <i>nuc</i> , 16S rRNA e <i>mecA</i> .
Yagci <i>et al.</i> , 2013 ⁽⁴⁶⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Ancara, Turquia	11 m (Fevereiro 2007 - Janeiro 2008)	248	123	20 (8.1%)	11 (55%)	Thy (5), Thy+Hem (1), NI (42)	Agar de sangue, MSA, Agar Columbia, BHI com 5% NaCl, Agar Schaedler, Agar chocolate, Eosin Methylene Blue agar, Oxidation/fermentation polymyxin- bacitracin-lactose agar, PCR do gene <i>nucA</i> .
Morelli <i>et al.</i> , 2015 ⁽²⁸⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Génova, Itália	-	222	134	28 (12.6%)	7 (25%)	Thy (27), Hem (1)	Agar de sangue, MSA, PCR do gene <i>nucA</i> e <i>mecA</i> .
Tkadlec <i>et al.</i> , 2015 ⁽⁴⁷⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Praga, República Checa	20 m (Julho 2011 - Março 2013)	107	92	9 (8.4%)	-	Thy (8), NI (1)	MALDI-TOF MS, PCR dos genes <i>mecA</i> , <i>spa</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>ermT</i> , <i>msrA</i> , <i>aadC</i> , <i>aphA3</i> e <i>aac-aphD</i>
Masoud-Landgraf <i>et al.</i> , 2016 ⁽¹⁶⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Graz, Áustria	36 m (Janeiro 2011 - Dezembro 2013)	147	127	12 (8.2%)	2 (17%)	Thy (13), Hem (2), NI (2)	TSA, Agar MacConkey, Agar de Sangue, SAID, Agar Schaedler,

									MALDI-TOF MS, PCR do gene <i>spa</i> , <i>mecA</i> .
Pakasticali <i>et al.</i> , 2016 ⁽²²⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Istambul, Turquia	10 m (Abril 2013 - Fevereiro 2014)	84	60	18 (21,4%)	2 (11%)	ND	Agar Columbia sangue, MSA, Agar Schaedler, PCR do gene <i>nuc</i> , <i>mecA</i> e <i>mecC</i> .
Carzino <i>et al.</i> , 2016 ⁽⁶⁷⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Melbourne, Austrália	12 m (2014 - 2015)	124	41	0 (0%)	0	0	MSA, Agar de sangue, PCR do gene <i>nuc</i> .
Suwantarat <i>et al.</i> , 2018 ⁽⁶⁶⁾	Unicêntrico, observacional, prospetivo	Maryland, U.S.A	6 m (Julho - Dezembro 2014)	550	290	49 (8,9%)	28 (57,1%)	-	MSA, MALDI-TOF MS.
Dodémont <i>et al.</i> , 2019 ⁽⁵⁰⁾	Multicêntrico, observacional, prospetivo	Bélgica (5 centros)	24 m (2012 - 2013)	510	380	36 (7%)	8 (22%)	-	Agar de sangue, MSA, Agar cromogénico, MALDI-TOF MS; PCR do gene <i>nuc</i> , 16S rRNA, <i>mecA</i> , <i>mecC</i> , <i>cfr</i> e <i>mupA</i> .
Wolter <i>et al.</i> , 2019 (71)	Multicêntrico, observacional, longitudinal	U.S.A (5 centros)	24 m	230	-	64 (27,8%)	-	Thy (103), FA (27), NC (55)	-

(a) - n° de doentes com isolamento de *MRSA-SCV*. Proporção de *MRSA-SCV* / *SASCV*

(b) - N° de espécimes de *SASCV* com auxotrofia específica. **Hem** – Hemina; **Tim** - Timidina; **Men** – Menadiona; **FA** – *Fatty-acids*, ácidos gordos; **Tim** + **Hem** - Timidina + Hemina. **ND** – Não determinada; NI – Não identificada; NC - Não conhecida auxotrofia de esta estirpe.

Tabela 3. Padrões de colonização das vias aéreas na Fibrose Quística, segundo a definição do *EuroCareCF Working Group*⁽¹⁵⁾.

Padrões de Colonização das vias aéreas na Fibrose Quística	
<i>Colonização inicial</i>	Primeiro isolamento do agente.
<i>Colonização crónica</i>	Quando num período de 12 meses em que se colhem, pelo menos, seis amostras de expetoração (ou oito amostras de aspirado nasofaríngeo) com um intervalo de, no mínimo um mês, 50% ou mais são positivas para o mesmo agente.
<i>Colonização intermitente</i>	Quando num período de 12 meses em que se colhem, pelo menos, seis amostras de expetoração (ou oito amostras de aspirado nasofaríngeo) com um intervalo de, no mínimo, um mês < 50% são positivas para o mesmo agente.
<i>Exacerbação pulmonar</i>	(definição assenta em critérios clínicos e pode surgir num contexto de colonização inicial, intermitente ou crónica)