



**SARA DE ASCENSÃO  
QUADROS LOPES**

**Suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de  
expetorações**



**SARA DE ASCENSÃO  
QUADROS LOPES**

**Suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de  
expetorações**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima de Jesus Madaíl, Médica especialista em Patologia Clínica, Diretora de Serviço e co-orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho às memórias de todos os profissionais do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Visconde de Salreu, que encerrou, durante a realização deste trabalho, a 19 de maio de 2012.

## **o júri**

presidente

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira  
Estagiária de Pós-Doutoramento, Instituto de Educação e Cidadania

Licenciada Maria de Fátima de Jesus Madaíl  
Diretora do Serviço de Patologia Clínica, Hospital Visconde de Salreu

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço á minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Fátima Madaíl pelo exemplo de excelente profissionalismo, pela amizade, pelo carinho e dedicação, pelo incentivo e por toda a ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Agradeço á minha co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Sónia Mendo pela sua amável atenção, disponibilidade e ensinamentos prestados.

Agradeço às minhas amigas, técnica Lúcia Botte e Dr.<sup>a</sup> Luísa Almeida por todo o incentivo e disponibilidade cedida nos horários de trabalho.

Muitíssimo obrigada a todas.

Agradeço do fundo de todo o meu ser, ao Rui, meu marido, á Inês e á Beatriz, as minhas filhas, por todo o amor e compreensão, para que eu pudesse realizar mais um sonho. Amo-vos muito.

## palavras-chave

Microbiologia; Infecções hospitalares; Expetoração; Microrganismos patogénicos; Antimicrobianos; Resistencia bacteriana; Consumo de antibióticos.

## resumo

A utilização abusiva de antimicrobianos na clínica hospitalar, originou um aumento de resistências e a consequente disseminação de estirpes bacterianas multirresistentes, sendo um grave problema de saúde pública. As infeções respiratórias são uma das principais causas de internamento hospitalar e os idosos são a faixa etária mais problemática, com aumento do consumo de antibióticos, aumento dos dias de internamento e com o elevado risco de contraírem mais infeções por bactérias multirresistentes.

O objectivo deste trabalho foi estudar as principais bactérias implicadas na infeção respiratória, num hospital da região de Aveiro e determinar o padrão de sensibilidade das estirpes mais isoladas.

Neste estudo foram utilizados os resultados dos exames bacteriológicos e culturais de expetoração que deram entrada no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Visconde de Salreu, num período de cinco anos (2006 a 2010).

De todas as amostras analisadas, 80% tiveram crescimento bacteriano. Os microrganismos mais isolados foram *Cândida* spp (23,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,9%), *Klebsiella pneumoniae* (11,4%) *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (10,4%) e *Acinetobacter* spp (6,8%).

Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram boa sensibilidade a Aminoglicosídeos e aos Carbapenemos e elevada resistência às Penicilinas e Cefalosporinas; as estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, boa sensibilidade aos Aminoglicosídeos, Carbapenemos e a algumas Cefalosporinas, com resistência às Penicilinas; as estirpes de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente, boa sensibilidade aos Glicopeptídicos, Tetraciclina e Aminoglicosídeos, mas 100% resistentes às Penicilinas e às Quinolonas; as estirpes de *Acinetobacter* spp, mais sensíveis aos Aminoglicosídeos, Carbapenemos a algumas Cefalosporinas e às Quinolonas, no entanto em 2010, algumas estirpes isoladas, apresentaram-se multirresistentes, sendo só sensíveis á Colistina.

Os resultados deste trabalho foram comparados com um estudo semelhante realizado no mesmo hospital de 2000 a 2005. Observou-se que passados 5 anos, a população em regime de internamento continua a ser a mais idosa, a percentagem de estirpes isoladas é semelhante, mas o perfil de sensibilidade das estirpes isoladas alterou-se, com um aumento geral das resistências às Penicilinas, às Sulfonamidas e às Cefalosporinas.

Relativamente ao consumo de antibióticos verificou-se que o protocolo em uso desde 2002, para o tratamento empírico inicial das pneumonias nosocomiais, não está de acordo com os resultados de suscetibilidade aos antimicrobianos.

## keywords

Microbiology; Hospital-acquired infections; Sputum; Pathogenic microorganisms; Antimicrobials; Bacterial resistance; Consumption of antibiotics

## abstract

The abusive use of antimicrobials in the hospital environment, led to an increase of resistance and the consequent spread of multiresistant bacterial strains, and a serious problem of public health. The respiratory infections are a major cause of hospitalization and the elderly are the age most problematic, with increased use of antibiotics, increased hospital days and the high risk of contracting more infections by multiresistant bacteria.

The aim of this work was to study the main bacteria involved in the respiratory infection, in an hospital in the region of Aveiro and determined the sensitivity pattern of strains more isolated. This study used the results of bacteriological examinations and cultural sputum, received at the Service of Pathology of the Hospital Visconde Salreu over a period of five years (2006 to 2010).

Of all the samples analyzed, 80% had bacterial growth. The most common microorganisms isolated were *Candida* spp (23.5%), *Pseudomonas aeruginosa* (13.9%), *Klebsiella pneumoniae* (11.4%) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (10.4%) and *Acinetobacter* spp (6.8%).

Regarding antimicrobial susceptibility, we found that strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed high sensitivity to aminoglycosides and carbapenems and high resistance to penicillins and cephalosporins; the isolates of *Klebsiella pneumoniae* were highly sensitive to aminoglycosides, cephalosporins and some carbapenems showed resistance to penicillins; the strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were highly sensitive to glycopeptides, aminoglycosides and tetracyclines, but 100% resistant to quinolones and penicillins; the strains of *Acinetobacter* spp were more sensitive to aminoglycosides, carbapenems and cephalosporins to some quinolones, however in 2010 showed up multiresistant, being only sensitive to Colistin.

These results were compared with a similar study conducted in the same hospital from 2000 to 2005. It was observed that after 5 years, inpatient population remains the older, the percentage of isolates are similar, but the sensitivity profile of the isolated strains changed, with an overall increase of the resistance to penicillins, to sulfonamides and cephalosporins.

As regards the use of antibiotics has been found that the protocol in use since 2002 and for initial empiric treatment of nosocomial pneumonia is not in accordance with the results of antibiotic susceptibility.

## ÍNDICE GERAL:

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ESTRUTURA DA CÉLULA BACTERIANA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>8</b>
3.1. Grupos de antibióticos.....	9
3.2. Mecanismos de ação dos antibióticos.....	10
3.2.1. Inibição da síntese da parede celular.....	11
3.2.2. Inibição da síntese proteica.....	16
3.2.3. Inibição da síntese dos ácidos nucleicos.....	19
3.2.4. Inibição da síntese do ácido fólico.....	20
3.2.5. Alteração da membrana celular.....	21
<b>4. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....</b>	<b>22</b>
<b>5. BACTERIAS MAIS COMUNS EM ISOLADOS DE EXPETORAÇÕES.....</b>	<b>28</b>
5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
5.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
5.3. <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistentes.....	31
5.4. <i>Acinetobacter spp.</i> .....	35
<b>6. EXPETORAÇÃO.....</b>	<b>38</b>
6.1. Fisiologia da expetoração.....	39
6.2. Exame direto da expetoração.....	39
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. MATERIAL.....</b>	<b>42</b>
<b>9. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....</b>	<b>43</b>
9.1. Fase Pré-analítica.....	43
9.2. Fase Analítica.....	43
9.3. Fase Pós-analítica.....	47

<b>10. RESULTADOS</b> .....	49
10.1. Análise de dados.....	49
10.2. Amostras.....	49
10.3. Microrganismos isolados.....	52
10.4. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes mais isoladas.....	54
10.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
10.4.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	56
10.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistentes.....	57
10.4.4. <i>Acinetobacter</i> spp .....	59
<b>11. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS</b> .....	61
<b>12. CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS</b> .....	65
<b>13. CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>14. BIBLIOGRAFIA</b> .....	69
<b>15. ANEXOS</b> .....	74

### **Lista de Abreviaturas:**

Algumas abreviaturas e acrónimos foram mantidos na terminologia original em inglês devido à sua utilização generalizada entre os profissionais de saúde.

**%:** Percentagem

**ATS:** American Thoracic Society

**Ca<sup>++</sup>:** íão cálcio

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CRKP:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistente

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**ESBL:** Estirpes produtoras de β-lactamases de espectro estendido

**HVS:** Hospital Visconde de Salreu

**K<sup>+</sup>:** íão potássio

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MIC:** Concentração Mínima Inibitória

**MMR:** Microrganismos Multirresistentes

**MRSA:** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

**MSSA:** Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*

**PABA:** Ácido Para-aminobenzoico

**PBPs:** Penicillin-Binding-Proteins

**PC:** Parede Celular

**PN:** Pneumonia Nosocomial

**PO:** Procedimentos Operativos

**PRP:** Compostos penicilina-penicilinase resistente

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucleico mensageiro

**RNA<sub>t</sub>:** Ácido Ribonucleico de transporte

**SNS:** Serviço Nacional de Saúde

**TSA:** Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

**VISA:** *Staphylococcus aureus* Vancomicina - resistência intermédia

**VRSA:** *Staphylococcus aureus* Vancomicina – resistente

**PPR:** Compostos penicilina-penicilinase resistentes

**VRE:** Vancomycin-resistant Enterococcus

## Lista de Figuras:

Figura 1: Estrutura celular bacteriana (adaptado de Infoescola, 2009) .....	4
Figura 2: Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivo (esquerda) e Gram-negativo (direita) (adaptado de Microbiologia online, 2010) .....	5
Figura 3: Exemplificação dos mecanismos de ação dos diferentes grupos de antibióticos (adaptado de Madigan, et al., 2003) .....	11
Figura 4: Estrutura química dos principais grupos dos $\beta$ -Lactâmicos (adaptado de Rosario, et al., 2006) .....	12
Figura 5: Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos (adaptado de ANVISA, 2007) .....	22
Figura 6: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de troca genética entre bactérias: A- Transformação, B- Transdução e C- Conjugação (adaptado de Pereira, 2011) .....	26
Figura 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (adaptado de Winsor GL, 2011) .....	28
Figura 8: Colónias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> na Gelose MacConkey (adaptado de Wikipedia,2012) .....	30
Figura 9: Fotografia de <i>Staphylococcus aureus</i> em microscópio eletrônico (adaptado de CDC, 2009) .....	32
Figura 10: Imagem de <i>Acinetobacter</i> spp em microscopia eletrônica (adaptado de CDC, 2010) .....	35
Figura 11: Percentagem de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados com crescimento bacteriano e sem interesse.....	51
Figura 12: Percentagem de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados com crescimento bacteriano, versus género, versus escalão etário.....	52
Figura 13 – Percentagem das estirpes isoladas por ano.....	52
Figura 14: Percentagem média de estirpes isoladas de 2006 a 2010.....	53
Figura 15: Percentagem de estirpes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensíveis aos antibióticos estudados.....	55
Figura 16: Percentagem de estirpes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sensíveis aos antibióticos estudados.....	56

Figura 17: Percentagem de estirpes de MRSA sensíveis aos antibióticos estudados.....	58
Figura 18: Percentagem de estirpes isoladas de MRSA versus MSSA.....	59
Figura 19: Percentagem de estirpes de <i>Acinetobacter</i> spp sensíveis aos antibióticos estudados.....	60
Figura 20: Percentagem de doentes com culturas positivas e negativas de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006) .....	61
Figura 21: Faixa etária dos doentes do internamento de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006) .....	62
Figura 22: Percentagem de microrganismos isolados de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006) .....	62
Figura 23: Percentagem de microrganismos isolados de 2006 a 2010.....	62
Figura 24: Percentagem de estirpes de <i>Pseudomonas</i> spp isolados, sensíveis aos antibióticos (adaptado de Madaíl, et al., 2006) .....	66
Figura 25: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de <i>Klebsiella</i> spp de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006) .....	64
Figura 26: Resumo do consumo de antibióticos no serviço de medicina de 2007 a 2010/doses unitárias .....	65
Figura 27: Numero total de doentes internados no Serviço de Medicina Interna de 2006 a 2010.....	66

### **Lista de Tabelas:**

Tabela 1: Critérios de validação de amostras de expetoração (adaptado de Murray, et al., 1975) .....	40
Tabela 2: Prevalência nos escalões etários, subdivididos pelo sexo masculino e feminino.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as infeções hospitalares têm sido objeto de interesse crescente, não só pelos profissionais de saúde, mas também pela população em geral através dos meios de comunicação social (Granito, et al., 2011).

As infeções hospitalares representam um problema de saúde pública a nível mundial, devido a um aumento dos dias de internamento, das taxas de mortalidade e de morbilidade e a um aumento considerável dos custos financeiros diretos e indiretos (Granito, et al., 2011).

A maioria de todas as infeções respiratórias agudas ocorrem em países em desenvolvimento onde a pobreza e os cuidados médicos inadequados contribuem para altas taxas de mortalidade (WHO, 2000).

A patologia infecciosa é uma das principais causas de internamento nos serviços de medicina portuguesas. Os dados existentes da realidade portuguesa são escassos de tal forma que é necessário extrapolar dados de outros países, possivelmente com floras bacterianas e perfis de resistências bastante diferentes (Marques, et al., 2005).

Há várias recomendações adaptadas aos próprios países que visam o tratamento e o controlo das patologias infecciosas, tais como, as recomendações da American Thoracic Society (ATS) que remontam de 1996 e a atualização destas em parceria com a *Infectious Diseases Society of America* em 2005, o Documento de Consenso de Intensivistas Latino-ibéricos em 2001, as recomendações das Sociedades Espanholas de Pneumologia, Medicina Intensiva e Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica em 2004 (Froes, et al., 2007).

Neste seguimento a Sociedade Portuguesa de Cuidados Intensivos e a Sociedade Portuguesa de Pneumologia, em 2007, decidiram criar um documento de consenso com um conjunto de recomendações sobre o tratamento de pneumonias, adaptadas à realidade e especificidade do nosso país (Froes, et al., 2007).

A pneumonia nosocomial (PN) é a segunda infeção nosocomial mais frequente e a que apresenta maior mortalidade. Admite-se um valor estimado entre 5 e 15 casos por 1000 admissões hospitalares, com o aumento da duração do internamento em 7 a 9 dias por doente e uma mortalidade entre 33 e 50%, com um profundo impacto na prescrição de

fármacos antimicrobianos, sendo responsável por mais de 50% dos antibióticos administrados nos Serviços de Medicina (Froes, et al., 2007).

Os antibióticos revolucionaram, a partir da década de 40, o tratamento dos doentes com infeções bacterianas. Contudo o seu uso maciço e frequentemente inadequado promoveu o aumento e a seleção de bactérias resistentes e multirresistentes, constituindo um grave problema nos serviços de saúde (Sousa, 2006).

Estudos recentes realizados pela OMS indicam que em cada 100 infeções respiratórias, apenas 20 necessitam de tratamento antibiótico. Esta situação é devida, em parte à confusão generalizada sobre a diferença entre infeções respiratórias virais e bacterianas. Isto significa que 80% dos doentes são tratados com medicamentos desnecessários favorecendo desta maneira o desenvolvimento de bactérias mais resistentes (WHO, 2000).

A emergência de resistência bacteriana aos antibióticos a nível comunitário e hospitalar é uma importante ameaça à saúde humana no século XXI. A humanidade depara-se com uma nova crise, em que as doenças facilmente curadas, estão rapidamente a tornarem-se difíceis de tratar devido ao problema dramático da resistência aos antibióticos (WHO, 2000).

Este problema de saúde pública tem implicações económicas, sociais e políticas, determinando elevada morbidade e mortalidade, aumento de custos e soluções limitadas de tratamento (Sequeira, 2004).

A resistência microbiana é um fenómeno biológico natural mas, torna-se um grave problema de saúde pública devido à má e negligente utilização dos antibióticos. Para o aparecimento e generalização das resistências contribuíram o mau diagnóstico da infeção, má acessibilidade aos fármacos, utilização inadequada de antibióticos nos humanos e animais, falta de informação e a “globalização” (WHO, 2000).

Os agentes etiológicos mais frequentes nas PN nos EUA, são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* e *Acinetobacter* spp (Granito, et al., 2011).

Num estudo em 2005, no Hospital de Santa Maria em Lisboa, os principais agentes das infeções respiratórias foram: *Escherichia coli*, *Candida* spp, *Enterococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus* coagulase negativos e *Pseudomonas* spp (Marques, et al., 2005).

No Hospital Central do Funchal e segundo o relatório de 2009, da “Comissão de Controle de Infecção-Vigilância Epidemiológica de Infecções Nosocomiais”, registou-se um aumento das bacteriemias de cerca de 27.5% em relação a 2008. Segundo este mesmo relatório os microrganismos mais encontrados foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* metilino-sensível (MSSA) e *Acinetobacter baumannii*. (Granito, et al., 2011).

No presente estudo as estirpes mais isoladas foram: *Candida* spp que foi isolada em 23.5% dos exames bacteriológicos e culturais de expetoração efetuados, com percentagens muito próximas, de 13.9%, 11.4% e 10.4% estão mais três estirpes, respetivamente: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* metilino-resistente. Com menor percentagem, está *Acinetobacter* spp com 6.8% de média de isolamentos.

A Direção Geral da Saúde, no documento “Relatório do Inquérito de Prevalência de Infecção 2010”, verificou em Portugal uma taxa de MRSA de 69.2% nas infeções respiratórias inferiores (Pina, et al., 2011).

Neste mesmo relatório, nos doentes com Pneumonia Nosocomial, a 77.8% foi realizado estudo microbiológico, para diagnóstico etiológico da infeção e observou-se um predomínio de *Staphylococcus* (*aureus* e *epidermidis*), *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* que corresponderam a 66% dos microrganismos isolados (Pina, et al., 2011).

Em Portugal, a vigilância dos microrganismos resistentes aos antibióticos em hospitais faz-se através da National Institute of Health / Microbiology Laboratory (Universidade de Lisboa) desde 1989. Os dados hospitalares de monitorização do consumo de antibióticos são recolhidos a nível nacional pelo Infarmed abrangendo cerca de 90% dos hospitais públicos (Froes, et al., 2007).

Segundo os últimos dados estatísticos disponíveis, que são de 2008, em Portugal, os antibacterianos representavam 4.7% do encargo financeiro do SNS (Pina, et al., 2011)

## 2. ESTRUTURA DA CÉLULA BACTERIANA

Bactérias são microrganismos unicelulares, procariotas, podendo viver isoladamente ou construir colónias de diversas formas (Cruickshank *et al*, 1973).

A célula bacteriana contém os componentes fundamentais de qualquer célula: membrana plasmática, citoplasma, ribossomas e uma molécula de DNA circular, mas não possui organelos membranares nem DNA organizado em verdadeiros cromossomas, como os das células eucariotas (Figura 1) (Sousa, 2006).

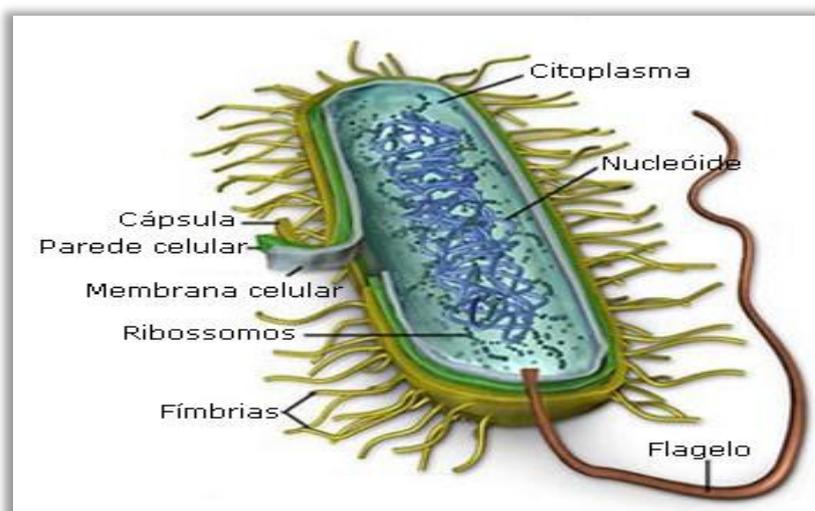


Figura 1: Estrutura celular bacteriana ( adaptado de Infoescola, 2009)

- **Parede Celular**

A parede celular é uma estrutura rígida, porosa e relativamente permeável, que recobre a membrana citoplasmática, confere forma à bactéria, pode ser esférica (coco), em bastonete (bacilo), em virgula (vibrião), espiralada (espiroqueta) ou filamentosa.

É responsável pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram (anexo 1: PO.18.01) (Ferreira, et al., 1998).

É uma estrutura complexa composta por peptidoglicanos ligados a proteínas (figura 2).

É alvo de muitos antibióticos, que inibem as enzimas transpeptidase e carboxipeptidase, responsáveis pela síntese dos peptidoglicanos. Os peptidoglicanos são compostos de

resíduos de dissacarídeos, moléculas alternadas de N-acetil-glicosamina e de ácido N-acetilmuramico, exclusivos das células procariotas.

As cadeias formadas são interligadas por pontes peptídicas. A formação dos peptidoglicanos é catalisada por enzimas denominadas de PBPs (proteínas ligantes de penicilina ou Penicillin-Binding-Proteins) (Sousa, 2006). Contém em espécies infecciosas a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) (Ferreira, et al., 1998).

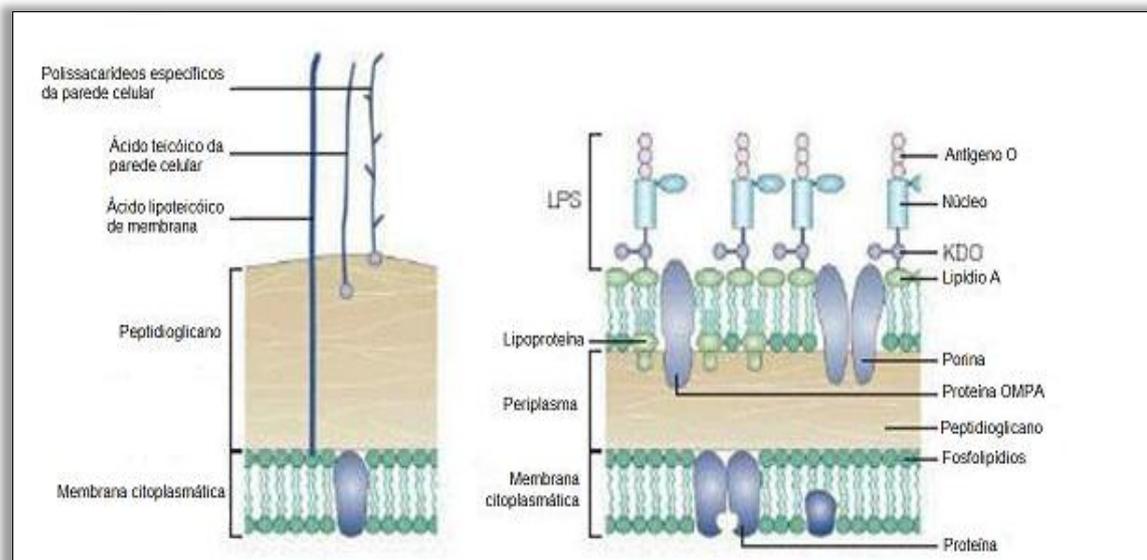


Figura 2: Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivo (esquerda) e Gram-negativo (direita) (adaptado de Microbiologia online, 2010).

- **Cápsulas**

É uma camada que recobre a parede celular, geralmente constituída por açúcares ou proteínas. Esta estrutura retém grande quantidade de água e assim, protege a bactéria contra a dessecação. As bactérias capsuladas geralmente são muito virulentas para o Homem, porque a cápsula mantém a célula bacteriana resistente á fagocitose (Ferreira, et al., 1998).

- **Membrana Celular**

Esta membrana também denominada membrana citoplasmática, é constituída por uma camada dupla de fosfolípidos, muito fina, elástica e permeabilidade seletiva a moléculas lipófilicas e impermeável a moléculas hidrófilas, mas também contém proteínas essenciais

auxiliadoras na permeabilidade de nutrientes, na defesa e na produção de energia, através do metabolismo oxidativo (Ferreira, et al., 1998).

- **Citoplasma**

Nas bactérias o citoplasma é o espaço intra-celular entre a membrana citoplasmática e o envoltório. É um líquido gelatinoso, o citosol, composto por 80% de água, sais, glicose e outras moléculas de açúcar e orgânicas, proteínas e também RNA e muitos ribossomas (Ferreira, et al., 1998).

- **Cromossoma**

O cromossoma que está presente nas bactérias é circular e possui uma única molécula de ácido desoxiribonucleico (DNA). Este cromossoma tem as informações genéticas da célula, tornando-a apta a realizar a auto-replicação cromossômica (Ferreira, et al., 1998).

- **Plasmídeo**

Esta estrutura é uma pequena molécula de DNA, não ligada ao cromossoma bacteriano e não está presente em todas as bactérias, sendo que seus genes não são codificadores de informações e características essenciais, mas dependendo da situação ambiental a que a célula é exposta, pode ter alguma vantagem seletiva em relação às outras bactérias que não o possuem. O plasmídeo protege a célula da ação antibiótica. Multiplicam-se, independentemente dos cromossomas (Ferreira, et al., 1998).

- **Ribossomas**

Dispersos no interior da célula, esta estrutura é responsável pela aparência rugosa que a célula tem. São locais de síntese proteica e são constituídos pelas subunidades 30S e 50S (Ferreira, et al., 1998).

- **Grânulos de Reserva**

Nas bactérias há acumulação de reservas, mas, de maneira diferente das células eucarióticas. Formam grânulos lipídicos insolúveis em água, compostos de glicose, ácido beta-hidroxibutírico e fosfato, formando cadeias complexas de açúcares (Ferreira, et al., 1998).

- **Flagelos**

Esta estrutura é responsável pela mobilidade da bactéria, está presa à membrana plasmática e são proteínas de origem endocelular, que se projetam para o exterior da célula (Ferreira, et al., 1998).

- **Fímbrias**

Estas estruturas são microfibrilas protéicas curtas e finas, características das bactérias Gram-negativas e diferentemente dos flagelos, não servem para locomoção, mas para adesão. Existe ainda um tipo específico de fímbria sexual, o *pili*. Estas auxiliam o processo de conjugação, ligando as bactérias para que troquem material genético (Ferreira, et al., 1998).

### 3. ANTIBIÓTICOS

Antes da introdução dos antibióticos para combate às bactérias, os principais microrganismos causadores de infecção hospitalar eram cocos Gram-positivos. A mortalidade dos indivíduos com bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, situava-se na ordem dos 80% dos infetados (Swartz, 1994).

Com a descoberta da penicilina no início da década de 1940, o prognóstico melhorou consideravelmente, mas desde 1942 foram identificadas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes. A atuação da penicilina sobre as bactérias Gram-positivas fez desenvolver as bactérias Gram-negativas como predominantes entre os agentes infecciosos nosocomiais. Estes acontecimentos marcaram o início da era do uso intensivo de antibióticos antibacterianos e simultaneamente o início do problema da resistência (Swartz, 1994).

O aumento do problema ocorre com a introdução e a vasta utilização de inúmeros antibióticos na década de 50, complicando-se a partir de 1960 com os novos antibióticos beta-lactâmicos (Sousa, 2006).

A importância das substâncias antimicrobianas no aumento da resistência reside no papel selecionador dos exemplares resistentes, através da pressão seletiva resultante de seu uso clínico em humanos e animais, uso industrial para a conservação de alimentos, uso comercial para a engorda de animais, tratamento de vegetais e uso experimental (Tavares, 2005).

Para um composto químico ser o ideal para o tratamento de infecções bacterianas, deverá ter várias características que permitam ao clínico escolher o melhor antibiótico para o doente (Sousa, 2006). Deverá:

- Alcançar os alvos moleculares, que são intracelulares. Para isso, o antimicrobiano, em quantidades suficientes precisa de ultrapassar a membrana celular bacteriana;
- Interagir com a molécula-alvo de modo a desencadear a morte da bactéria;
- Evitar a ação das bombas de efluxo que levam os antimicrobianos para fora da célula bacteriana;
- Evitar a inativação por enzimas capazes de modificar o antimicrobiano no ambiente extracelular ou no interior da célula bacteriana.

O tratamento empírico requer uma avaliação prévia de todos os fatores de risco do doente, a idade, situação clínica do doente, o início da infeção (inicial ou tardia), os microrganismos locais, as possíveis resistências, mas também deverá ter em conta a toxicidade e os possíveis efeitos secundários do antibiótico, a via de administração, o espectro de ação e a relação custo/eficácia do antibiótico.

Após os resultados microbiológicos, o clínico pode escolher qual o antibiótico mais apropriado e com a avaliação clínica, passar então a um tratamento específico, evitando a utilização imprópria de antibióticos.

Os antibióticos podem ser (Sousa, 2006):

- Substâncias químicas naturais, quando obtidas a partir de microrganismos;
- Substâncias sintéticas, quando a sua síntese é totalmente química;
- Substâncias semi-sintéticas, quando são obtidas por modificação química de antimicrobianos naturais.

### **3.1. Grupos de antibióticos**

O termo sensibilidade refere-se à sensibilidade de uma estirpe bacteriana perante a ação de um antibiótico, este pode ter uma atividade bactericida, em que mata as bactérias, ou uma atividade bacteriostática, quando apenas inibe a multiplicação e o crescimento bacteriano.

Quando o antibiótico administrado tem atividade bacteriostática, o doente (hospedeiro infetado) tem condições imunológicas para ativar a resposta imunitária e eliminar o agente infeccioso, sendo a morte celular provocada pelo sistema imunitário.

Quando o doente está imunitariamente debilitado e incapaz de destruir o agente infeccioso, então deverão ser administrados antibióticos com ação bactericida (Sousa, 2006).

Estas características permitem agrupar os antibióticos:

**Antibióticos bactericidas:**

- $\beta$ - lactâmicos
- Glicopeptídicos
- Aminoglicosídeos
- Quinolonas
- Fosfomicina
- Rifampicinas
- Tetraciclínas
- Metronidazol
- Daptomicinas
- Polimixinas

**Antibióticos bacteriostáticos:**

- Cloranfenicol
- Sulfonamidas
- Oxazolidononas
- Macrolídeos
- Estreptograminas
- Ácido Fusídico

### **3.2. Mecanismos de ação dos antibióticos**

Os diferentes grupos de antibióticos antibacterianos exploram as diferenças entre as células bacterianas (procariotas) e as células dos mamíferos (eucariotas). Para que o antibiótico atue, isto é, encontre o seu alvo na célula bacteriana, as bactérias têm de estar em divisão ativa (Sousa, 2006).

Para compreender como os antibióticos atuam nas bactérias, é necessário rever os cinco principais mecanismos de ação dos antibióticos, com exemplificado na figura 3 (Sousa, 2006).

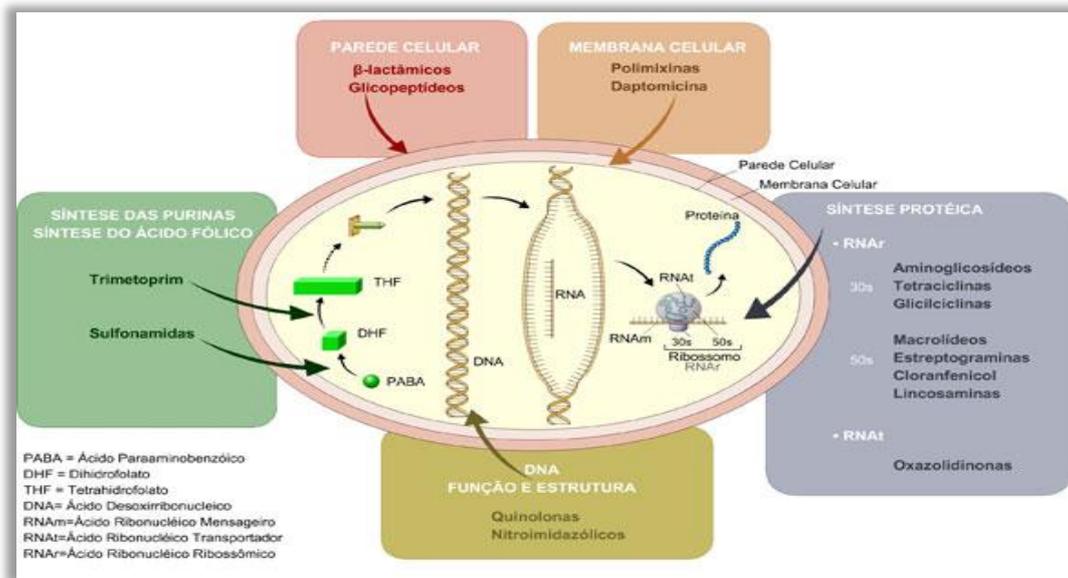


Figura 3: Exemplificação dos mecanismos de ação dos diferentes grupos de antibióticos (adaptado de Madigan, et al., 2003).

### 3.2.1. Inibição da síntese da parede celular

É o mecanismo mais comum de atividade antibacteriana (Sousa, 2006).

Interferem na síntese da parede celular, inibem a síntese do peptidoglicano.

Como interferem na síntese da parede celular, são bactericidas:

- β-lactâmicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos, Monobactams.
- Glicopeptídicos: Vancomicina e Teicoplanina.
- Bacitracina.
- Fosfomicina.

#### ✓ Antibióticos β-lactâmicos

É uma classe de antibióticos que possuem como característica comum, o fato de terem um anel β-lactâmico constituído por três átomos de carbono e um átomo de nitrogénio, com radicais substituintes, um anel tiazolidina nas penicilinas ou um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas (Sousa, 2006).

As penicilinas e as cefalosporinas são a sub-classe dos antibióticos β-lactâmicos caracterizado por três aspetos estruturais em comum: estrutura β-lactâmica condensada, grupo carboxilo livre e um ou mais grupos amina substituídos na cadeia lateral (figura 4) (Sousa, 2006).

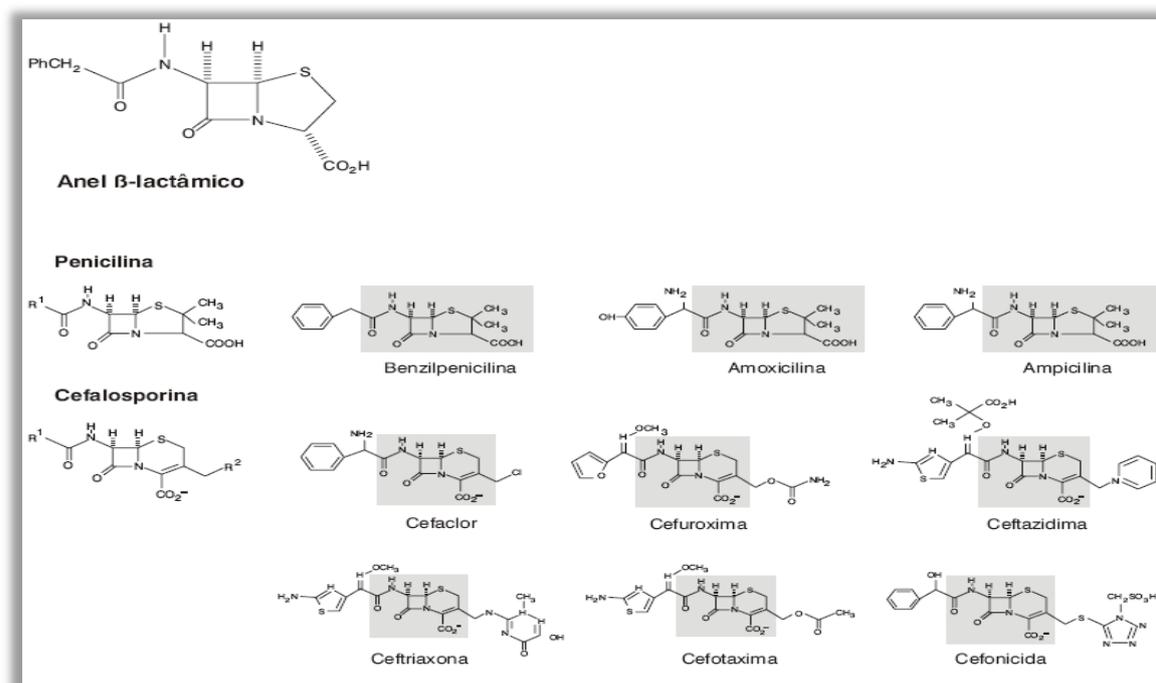


Figura 4: Estrutura química dos principais grupos dos  $\beta$ -lactâmicos (adaptado de Rosario, et al., 2006).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ligam-se às PBPs. Quando bactérias em crescimento são expostas a esses antibióticos, ligam-se às PBPs específicas da parede celular bacteriana e inibem a formação das ligações cruzadas entre as cadeias de peptidoglicanos. Isso ativa as autolisinas, que degradam a parede celular, o que resulta na morte das células bacterianas. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos podem ser inativados pelas hidrolases bacterianas, as denominadas  $\beta$ -lactamases (Sousa, 2006).

- **Penicilinas**

Todas as penicilinas possuem a mesma estrutura geral  $\beta$ -lactâmica tiazolidínica. A intensidade da atividade antibacteriana depende do grupo químico da cadeia lateral. As penicilinas são bactericidas que atuam por inibição da síntese da parede bacteriana e ativação do seu sistema autolítico endógeno (INFARMED, 2011).

No mecanismo de ação das penicilinas, estas formam um composto inativo peniciloenzima com as enzimas PBPs, a penicilina ocupa o lugar do substrato transpeptidase, inibindo as atividades enzimáticas e a síntese do peptidoglicano.

Estes antibióticos têm de atravessar a parede celular bacteriana (PC) e inibir as PBPs.

Pertencem a este grupo de penicilinas os seguintes antibióticos: Penicilina, Meticilina (oxacilina), Amoxicilina, Ampicilina e Piperacilina (Sousa, 2006).

Habitualmente as penicilinas são divididas em 5 grandes grupos de acordo com o seu espetro de atividade:

- 1-Penicilinas naturais ou benzilpenicilinas
- 2-Aminopenicilinas,
- 3-Isoxazolilpenicilinas ou penicilinas resistentes às penicilinases,
- 4-Penicilinas anti-pseudomonas ou de largo espetro
- 5-Amidinopenicilinas.

- **Cefalosporinas**

Os antibióticos do grupo das cefalosporinas são classificados por gerações de acordo com o seu espetro de atividade (Sousa, 2006).

As cefalosporinas de 1ª geração são ativas essencialmente sobre bactérias Gram-positivas, sendo limitada a sua atividade sobre algumas Gram-negativas. À medida que se avança nas diferentes gerações, o espetro para Gram-negativo amplia-se (as cefalosporinas de 4ª geração são as mais ativas) mas perde-se alguma atividade para as bactérias Gram-positivo (INFARMED, 2011).

- Cefalosporinas de 1ª geração: Têm atividade contra Gram-positivos e pouca atividade contra Gram-negativos, são exemplos: Cefalotina; Cefazolina; Cefalexina e Cefadroxil (Sousa, 2006).

- Cefalosporinas de 2ª geração: Têm atividade melhor contra Gram-negativos e algumas cefalosporinas têm atividade antianaeróbica, são exemplos: Cefaclor, Cefuroxima, Cefoxitina e Cefotetan (Sousa, 2006).

- Cefalosporinas de 3ª geração: Apresentam menor atividade contra Gram-positivos, porém com maior atividade contra *Enterobacteriaceae*, são usualmente utilizadas no tratamento de infeções graves nosocomiais. O uso intensivo destas cefalosporinas provocou o aparecimento de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espetro (ESBLs) (Sousa, 2006). Podem ser subdivididas quanto à via de administração,

assim, por via oral é Cefixima, Cefetamet pivoxil, Cefpodoxima e Ceftributeno. Pela via parental é a Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima (INFARMED, 2011).

- Cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração: Têm um espectro de atividade semelhante ao da 3<sup>a</sup> geração, mas com maior estabilidade à hidrólise por  $\beta$ -lactamases. São as Cefepima, Cefpiroma, Cefoselis, Cefozopran e Cefaclidina (INFARMED, 2011).

- Cefalosporinas de 5<sup>a</sup> geração: Tem um espectro de atividade semelhante à Cefepima contra *Pseudomonas aeruginosa*, ativa na maioria das *Enterobacteriaceae*, perde atividade contra ESBLs, no entanto, possui boa atividade contra MRSA e *Enterococcus faecalis* MR. É a Ceftobiprole (INFARMED, 2011).

- **Carbapenemos**

Nestes antibióticos existe uma ligação dupla entre o carbono 2 e 3, o átomo de enxofre no anel tiazolidinico é substituído por um átomo de carbono. Não existe a formação do intermediário peniciloenzima fazendo o ataque direto ao anel  $\beta$ -lactâmico.

É um antibiótico de largo espectro, por ter uma excelente penetração dos canais de porina, resiste à hidrólise das  $\beta$ -lactamases, incluindo as ESBLs e com forte ligação às PBPs (Sousa, 2006).

São utilizados nos tratamentos de infecções graves com bactérias multirresistentes Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbios após o resultado do TSA (INFARMED, 2011).

Pertencem a este grupo o Imipenem e o Meropenem (Sousa, 2006).

O Imipenem é mais ativo contra bactérias Gram-positivas e tem grande afinidade para os PBPs dos Gram-negativos especialmente das *P. aeruginosa* e das PBPs de *S. aureus*, no entanto não tem atividade contra MRSA (Sousa, 2006).

O Meropenem é também de largo espectro de atividade, mas o seu uso é reservado para o tratamento de infecções graves por bactérias multirresistentes, especialmente, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Também não tem atividade contra MRSA, *C. difficile* (Sousa, 2006).

- **Monobactamos**

Antibiótico sintético  $\beta$ -lactâmico monocíclico, conhecido por Aztreonam. No seu mecanismo de ação permeia os canais de porina e tem afinidade para os PBP<sub>3</sub>. Tem fraca afinidade para os PBPs das bactérias Gram-positivas (Sousa, 2006).

É usado como alternativa aos aminoglicosídeos no tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas, sendo inativado pelas  $\beta$ -lactamases produzidas pelas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Não é ativo contra bactérias Gram-positivas e anaeróbias estritas (INFARMED, 2011).

- ✓ **Glicopeptídicos**

Fazem parte deste grupo a Vancomicina e Teicoplanina. São inibidores da biossíntese do peptidoglicano na fase membranar, ligando-se ao aminoácido D-alanina quando as sub-unidades do peptidoglicano estão localizadas no exterior da membrana citoplasmática (Sousa, 2006).

A Vancomicina forma um complexo com peptidoglicano, impedindo a ligação da transpeptidase e as ligações cruzadas. Ela bloqueia a incorporação no peptidoglicano das subunidades N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, ao se ligar reversivelmente a estas moléculas. Com parede celular deficiente as bactérias não resistem às pressões osmóticas e morrem. A Vancomicina é inativa contra bactérias Gram-negativas porque a molécula é muito grande para passar pelos poros da membrana externa e atingir o sítio-alvo do peptidoglicano (Sousa, 2006).

O mecanismo de ação é diferente dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, porque estirpes de MRSA são sensíveis à Vancomicina (Sousa, 2006).

A Teicoplanina é um antibiótico com um mecanismo de ação idêntico ao da Vancomicina, quimicamente semelhante, mas com maior lipofilia, o que favorece a sua rápida penetração através dos tecidos e para o interior dos fagócitos (Sousa, 2006).

- ✓ **Bacitracina**

A Bacitracina, um antibiótico polipeptídico composto por três componentes, denominado bacitracina A (o mais importante), B e C. A Bacitracina comercial é uma mistura de pelo menos nove bacitracinas (Sousa, 2006).

Dependendo da concentração, a bacitracina é bacteriostática ou bactericida. Age, inibindo a incorporação de aminoácidos e nucleótídeos na parede celular, mas também pode danificar as membranas formadas produzindo a lise e a morte das bactérias.

É um antibiótico inibidor da biossíntese do peptidoglicano, atua na fase membranar formando complexos com o pirofosfato do lipídeo-P-P, não ocorrendo a sua desfosforilação. Este complexo torna o grupo pirofosfato inacessível à ação das enzimas fosfatase, não ocorrendo a formação de Lipídeo-P, indispensável á biossíntese do peptidoglicano (Sousa, 2006).

#### ✓ **Fosfomicina**

A fosfomicina é um antibiótico bacteriolítico e atua nas fases iniciais da biossíntese do peptidoglicano, inibindo a enzima MurA, atravessando facilmente a membrana externa das bactérias Gram-negativo (Sousa, 2006).

### **3.2.2. Inibição da síntese proteica**

Devido às diferenças entre os ribossomas bacterianos e os das células humanas é possível a utilização terapêutica de antibióticos inibidores da síntese proteica, sem efeitos graves para o Homem. No entanto as mitocôndrias nas células eucariotas possuem ribossomas do tipo bacteriano (70S) (Sousa, 2006).

A seletividade destes antibióticos é um resultado de diferenças no ribossoma 70S procariótico e o 80S eucariótico. Visto que os ribossomas mitocondriais são semelhantes aos ribossomas procarióticos, estes antibióticos podem ter alguma toxicidade. O complexo ribossomal 70S é formado pela associação das subunidades 30S e 50S, ambas as subunidades são o alvo dos diferentes antibióticos com ação de inibir a síntese proteica (Sousa, 2006).

#### **Antibióticos que se ligam à subunidade ribossômica 30S:**

- **Aminoglicosídeos**

Os antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitolis constituem um grupo bastante heterogéneo quanto á sua composição química, propriedades antibacterianas e

farmacológicas. São exemplos: Estreptomicina, Canamicina, Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Netilmicina e Neomicina (Sousa, 2006).

Os aminoglicosídeos ligam-se irreversivelmente ao ribossoma 30S e bloqueiam o complexo de iniciação 30S (30S-mRNA-tRNA), impedindo uma iniciação posterior. Os aminoglicosídeos também inibem a síntese proteica que já tenha sido iniciada, induzindo erro de leitura do mRNA. São bactericidas (Sousa, 2006).

- **Tetraciclina**

As Tetraciclina ligam-se reversivelmente ao ribossoma 30S e inibem a ligação do aminoacil-t-RNA ao sítio recetor no ribossoma 70S. As Tetraciclina são inibidores específicos do ribossoma procariótico, bloqueiam o recetor na subunidade 30S que se liga ao RNAt durante a tradução génica. Como o ribossoma eucariota é substancialmente diferente, não é afetado. A síntese de proteínas é, portanto, inibida na bactéria, o que impede a replicação e leva à morte celular. São bactericidas. São exemplo: Tetraciclina, Minociclina, Oxitetraciclina, Clorotetraciclina e Doxiciclina (Sousa, 2006).

#### **Antibióticos que se ligam à subunidade ribossómica 50S:**

- **Cloranfenicol**

O Cloranfenicol exerce a sua atividade bacteriostática por se ligar reversivelmente à subunidade 50S dos ribossomas 70S bacterianos, na cavidade da peptidiltransferase, graças à interação dos átomos de oxigénio do grupo p-nitro com os nucleótidos da cavidade. Isto impede a ligação do aminoacil-tRNA ao local acetor na subunidade 50S ribossomal e a transferência de aminoácidos para as cadeias peptídicas em crescimento.

A formação de ligações peptídicas é, então, inibida. São bacteriostáticos. Como têm elevada lipofilia atravessam a dupla membrana mitocondrial, atingindo os ribossomas das células do Homem, causando efeitos secundários graves irreversíveis tais como a supressão da função da medula óssea (Sousa, 2006).

- **Macrolídeos**

São bacteriostáticos, mas em altas doses podem ter ação bactericida. Os macrolídeos inibem a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P no ribossoma ao ligar-se

ao RNA 23S da subunidade 50S. Inibem a síntese protéica por se ligarem a subunidade 50S dos ribossomas, o que bloqueia o alongamento do peptídeo (Sousa, 2006).

Apresentam um anel de lactona macrocíclica, tendo usualmente 14, 15 ou 16 átomos, ao qual se ligam um ou mais desoxiglicóis.

Macrolídeos com 14 átomos no anel lactónico: Eritromicina, Claritromicina.

Macrolídeos com 15 átomos no anel lactónico: Azitromicina.

Macrolídeos com 16 átomos no anel lactónico: Espiramicina, Miocamicina (Sousa, 2006).

Os Cetólidos são uma nova classe de antibióticos derivados dos macrolídeos com 14 átomos, especificamente projetados para o tratamento de infeções respiratórias adquiridas na comunidade. A Telitromicina, utilizada na terapêutica desde 2004, derivado da Eritromicina A, é ativa contra as estirpes resistentes á Eritromicina, menos suscetível aos mecanismos de resistência mediado pelas metilases e pelas bombas de efluxo. A Cetromicina, tem o dobro da afinidade que a Telitromicina e dez vezes mais que a Eritromicina (Sousa, 2006).

- **Estreptograminas**

Atualmente, na terapêutica, usa-se uma associação de duas estreptograminas, a Estreptogramina A: Dalfopristina e a Estreptogramina B: Quinupristina. São derivados semissintéticos de Pristinamicina (figura 13) (Sousa, 2006).

A associação de 30% de Quinupristina e 70% de Dalfopristina, é activa contra *S. aureus* metilicina resistente e vancomicina resistentes. Cada composto separado é bacteriostático, mas a administração de ambos tem efeito bactericida. A Dalfopristina liga-se irreversivelmente à subunidade ribossómica 50S e induz transformação que facilita a ligação da Quinupristina. A Dalfopristina evita o alongamento da cadeia e a Quinupristina inicia a libertação prematura dos peptídeos do ribossoma (Sousa, 2006).

- **Oxazolidinonas**

Esta nova classe de antibióticos foi descoberta nos anos 80, são compostos sintéticos não tóxicos, nomeadamente o Linezolid.

O Linezolid liga-se à subunidade 50S do ribossoma, o que distorce o sítio de ligação do RNAm na subunidade 30S, inibindo, assim, a formação do complexo de iniciação 70S.

É bacteriostático. As Oxazolidinonas inibem o início da síntese proteica atuando sobre a peptidiltransferase, evitando a tradução da mensagem codificada do RNAm (Sousa, 2006).

- **Ácido fusídico**

Liga-se reversivelmente à subunidade 50s do ribossoma, bloqueando a enzima de translocação do ribossoma ao longo do RNAm. Tem efeito bacteriostático (Sousa, 2006).

### 3.2.3. Inibição da síntese dos ácidos nucleicos

Os antibióticos com este mecanismo de ação atuam inibindo, direta ou indiretamente, as enzimas que atuam na síntese dos ácidos nucleicos.

- **Rifampicina**

Inibidores da síntese de RNA e das suas funções. Estes antibióticos inibem a ação da enzima RNA polimerase, impedindo a transcrição do DNA e inibem a iniciação da síntese de RNAm. Tem efeito bactericida e é um antituberculoso de 1ª linha (Sousa, 2006).

- **Metronidazol**

A molécula de Metronidazol na sua forma intacta não tem ação antimicrobiana. A droga após entrar na célula microbiana é ativada por redução, na ausência de O<sub>2</sub> e os produtos intermediários, reduzidos, interagem com o DNA nas bactérias, causando quebra da molécula. Este composto reduzido interatua com o DNA, quebra a cadeia, destabiliza o seu enrolamento e provoca a morte celular (Sousa, 2006).

- **Quinolonas**

Antibióticos de síntese química, derivadas de um produto secundário da síntese da cloroquina, 7-cloroquinolona, com uso terapêutico desde os anos 60 da primeira quinolona, o ácido nalidíxico. Esta molécula de ácido nalidíxico dá origem ao núcleo básico das quinolonas (Sousa, 2006).

As quinolonas inibem a topoisomerase IV porque interferem no enrolamento do DNA, impedindo a replicação e a transcrição do DNA. Inibem, também, a DNA girase, esta remove os superenrolamentos à frente da forquilha de replicação e a topoisomerase IV abre

a molécula de DNA antes da forquilha de replicação. A inibição destas enzimas tem ação bactericida (Sousa, 2006).

As quinolonas são classificadas em quatro gerações (Sousa, 2006):

- Quinolonas de 1ª geração: Moléculas com moderada atividade contra bactérias Gram-negativo. São exemplos: Ácido nalidíxico, Ácido pipemidíco e Rosoxacino.

- Quinolonas de 2ª geração: Moléculas com boa atividade contra bactérias Gram-negativo e fraca atividade contra bactérias Gram-positivo. São exemplos: Ciprofloxacina, Ofloxacina; Norfloxacina, Pefloxacina e Lomefloxacina.

- Quinolonas de 3ª geração: Moléculas com boa atividade contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. São exemplos: Levofloxacina, Moxifloxacina, Gemifloxacina e Gatifloxacina.

- Quinolonas de 4ª geração: Moléculas com boa atividade contra bactérias Gram-negativo e anaérobios estritos e muito boa atividade contra bactérias Gram-positivo. São exemplos: Trovafloxacina, Clinafloxacina e Sitafloxacina.

#### **3.2.4. Inibição da síntese do ácido fólico**

A este grupo pertencem os antibióticos antimetabólicos, porque impedem a biossíntese dos cofatores folato, essenciais para a produção de bases purinas e aminoácidos, necessários para a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas nas bactérias.

A seletividade destes antibióticos é uma consequência do fato de que as bactérias não podem usar ácido fólico pré-formado e precisam de sintetizar o seu próprio ácido fólico, contrariamente, às células de mamíferos que usam o ácido fólico obtido a partir do alimento (Sousa, 2006).

- **Sulfonamidas**

Estes antibióticos são análogos do ácido para-aminobenzóico (PABA) e inibem de forma reversível a enzima dihidropteroato sintetase, impedindo o crescimento bacteriano por carência de ácido fólico. Estes antibacterianos ligam-se à di-hidrofolato-redutase e inibem a formação do ácido tetrahydrofólico. Têm assim efeito bacteriostático (Sousa, 2006).

Quando Trimetoprim e Sulfonamidas são usados em associação, na proporção de 1:5, denominada Cotrimoxazol, têm um efeito sinérgico e bactericida, esta associação, como tal, reduz o desenvolvimento de resistência microbiana.

### 3.2.5. Alteração da membrana celular

Os antibióticos que provocam alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática por interação com os fosfolípidos, são denominados antibióticos antimembranares.

A alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática por agentes químicos ou físicos, permite um efluxo de  $K^+$ , de nucleótidos e aminoácidos, provocando morte celular, são antibióticos bactericidas.

Estes antibióticos são pouco seletivos devido à membrana celular procariota e eucariota serem bastante semelhantes (Sousa, 2006).

- **Polimixinas**

Estas são peptídeos policationicos, anfotéricos, com estrutura cíclica com uma cadeia de ácido gordo unido a uma ligação amida. São bastante tóxicas. Na clínica são utilizadas as Polimixinas B e E (Colistina), por serem as de menor toxicidade (Sousa, 2006).

Possui atividade bacteriana contra a maior parte dos microrganismos Gram-negativos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, espécies de *Acinetobacter* e *E. coli*. As Polimixinas alteram a morfologia e a permeabilidade da membrana exterior, causando uma perda seletiva de proteínas situadas entre a membrana citoplasmática e a membrana exterior (Sousa, 2006).

- **Daptomicinas**

Este antibiótico liga-se irreversivelmente à membrana citoplasmática, mediada pelos iões  $Ca^{++}$ , sem atingir o citoplasma bacteriano. O mecanismo de ação consiste na ligação da Daptomicina à membrana celular bacteriana levando à rápida despolarização da membrana citoplasmática devido ao efluxo de iões  $K^+$ , o que determina a inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, além do extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana (Sousa, 2006).

#### 4. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antimicrobianos implica a ausência do efeito inibidor ou letal. Este fenómeno ocorre sempre que uma bactéria possui características genéticas responsáveis pela produção e expressão de mecanismos de resistência. Para se definir o conceito de resistência, tem que se ter em conta a estirpe bacteriana, o antimicrobiano e a sua concentração no hospedeiro. Um microrganismo é resistente quando apresenta um fenótipo de resistência definido por uma concentração inibitória para esse antimicrobiano, permitindo assim distinguir vários mecanismos de resistência (Sousa 2006).

A resistência a determinado antimicrobiano pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana (resistência natural) ou uma capacidade adquirida (resistência adquirida). É habitual que as bactérias expressem mais do que um destes mecanismos, estando desta forma aumentado o nível de resistência. O conhecimento deste tipo de mecanismos de resistência permite prever a inatividade de um antibiótico e a utilização de terapia empírica (Anglada, 1997).

Os quatro principais mecanismos de resistência bacteriana estão exemplificados na figura 5.

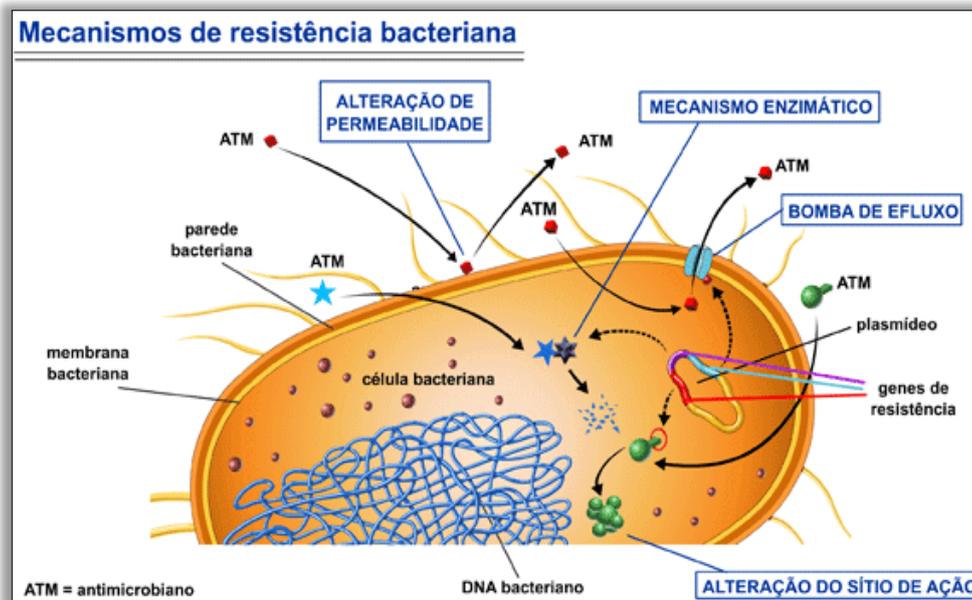


Figura 5: Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos ( adaptado de ANVISA, 2007).

- **Alteração da permeabilidade**

As bactérias utilizam esta estratégia na aquisição de resistência. A permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas. A permeabilidade desta membrana reside na presença de proteínas transmembranares, as porinas, que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e em seguida para o interior da célula. O fecho das porinas por alteração da sua forma leva a membrana externa a impedir a entrada dos antibióticos para o espaço periplasmático.

A permeabilidade limitada é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos aos  $\beta$ -lactâmicos e pela resistência de *Pseudomonas aeruginosa* ao Trimetoprim (Anglada, 1997).

- **Mecanismo enzimático**

O mecanismo de resistência bacteriana mais importante e frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas. As bactérias possuem enzimas com capacidade de alterar a estrutura do antibiótico (Anglada, 1997).

As  $\beta$ -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos se ligam às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Foram descritas numerosas  $\beta$ -lactamases diferentes. Essas enzimas são codificadas em cromossomas através de plasmídeos ou transposões, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou induzido (Anglada, 1997).

A resistência quase universal de *S. aureus* à Penicilina é mediada por uma  $\beta$ -lactamase indutível, codificada por plasmídeo. Foram então, desenvolvidos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos capazes de se ligarem irreversivelmente às  $\beta$ -lactamases, inibindo-as. Estes compostos (Ácido clavulânico, Sulbactam, Tazobactam) foram combinados com as Penicilinas para restaurar sua atividade, contra a presença de  $\beta$ -lactamases em *S. aureus* e *Haemophilus* (Anglada, 1997).

- **Bomba de efluxo**

As bombas de efluxo permitem às bactérias manter no seu interior baixas concentrações de substâncias tóxicas, expulsando para o exterior metabolitos, detergentes solventes orgânicos e antibióticos. O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio

intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos, como aos  $\beta$ -lactâmicos, às Quinolonas ou às Tetraciclinas.

A resistência às Tetraciclinas codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* resulta deste efluxo ativo (Anglada, 1997).

- **Alteração do sítio de ação**

A alteração do local-alvo, uma proteína, onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias adquirem um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original (Anglada, 1997).

Alternativamente, um gene recém-adquirido pode atuar para modificar um alvo, tornando-o menos vulnerável a determinado antimicrobiano. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposões codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos como ocorre com Eritromicina e Clindamicina (Anglada, 1997).

Segundo a natureza da proteína modificada, pode-se dividir este mecanismo em três grupos:

- 1 - Resistência por modificação de proteínas ribossômicas. Esta modificação confere resistência aos Aminoglicosídeos, Tetraciclinas, Macrólidos e Lincosamidas (Anglada, 1997);

- 2 - Alteração dos precursores da parede celular;

- 3 - Modificações de enzimas essenciais:

*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina e *Staphylococcus* coagulase-negativos adquiriram o gene cromossômico Mec A e produzem uma PBP resistente aos  $\beta$ -lactâmicos, que é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras PBPs essenciais são inativadas por antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (Anglada, 1997).

A resistência adquirida numa bactéria observa-se quando, anteriormente, era sensível a um determinado antibiótico e desenvolve resistência. Para adquirir resistência, a bactéria altera o seu DNA, por indução de mutação no DNA nativo ou introdução de um DNA

estranho, por genes de resistência, que podem ser transferidos entre géneros ou espécies de bactérias (Sousa, 2006).

Os genes de resistência quase sempre fazem parte do DNA de plasmídeos extracromossómicos, que podem ser transferidos entre bactérias. Alguns genes de resistência fazem parte de unidades de DNA denominadas transposões que se movem entre cromossomas e plasmídeos transmissíveis. O DNA estranho pode ser adquirido mediante transformação, resultando em trocas de DNA cromossómico entre espécies, com subsequente recombinação entre espécies (Anglada, 1997).

Existem diferentes mecanismos, através dos quais as bactérias adquirem e transferem material genético. Estes mecanismos permitem às bactérias trocar informação responsável pela expressão da resistência face a determinados antimicrobianos (Sousa, 2006).

- **Mutação**

A mutação ocorre espontaneamente após um grande número de divisões bacterianas num curto espaço de tempo. Essa rápida divisão pode levar à troca de bases no processo de síntese do DNA, resultando na modificação das características genéticas da bactéria. Denomina-se transferência vertical, porque a resistência é adquirida apenas para um tipo de antibiótico.

A mutação pode ocorrer espontaneamente nos plasmídeos ou por transposição de fragmentos de DNA. Os plasmídeos e os transposões são os responsáveis pela dispersão dos genes de resistência aos antibióticos entre as bactérias (Ferreira, et al., 1998).

- **Plasmídeos**

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossómicas, circulares, fechadas, altamente compactas, replicam-se automaticamente, são menores que o DNA cromossómico e existem em número variável nas células, não se recombina com o DNA da bactéria.

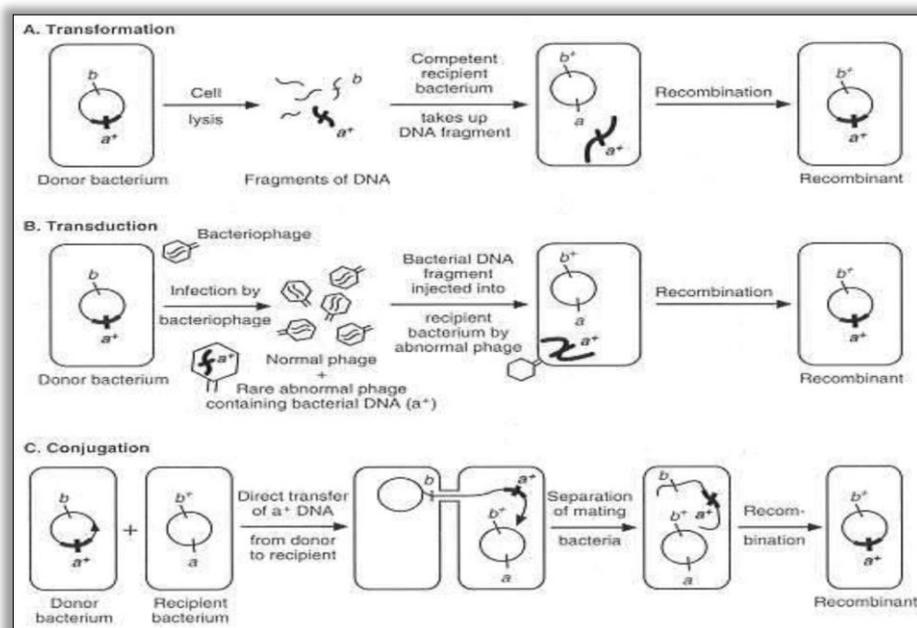
Transportam genes que conferem numerosas funções às bactérias, incluindo resistências aos antibióticos ou genes que codificam fatores de virulência (adesinas e toxinas) (Ferreira, et al., 1998).

- **Transposição**

A transposição é o processo no qual ocorre movimento de transposões, resultando em modificações na estrutura do DNA. Transposões são pequenos fragmentos de DNA que espontaneamente se recombinam com o DNA do hospedeiro capazes de trocar de posição, isto é, do cromossoma para plasmídeo, de um plasmídeo para outro ou de um plasmídeo para um cromossoma (Ferreira, et al., 1998).

Os transposões não possuem funções auto-replicativas, não necessitam de regiões homólogas entre o transposão e o local do DNA onde se vai inserir, requerem a enzima transposase e extremidades contendo sequências de repetição invertida. Os transposões complexos podem transportar genes diversos que conferem resistência antibiótica (Ferreira, et al., 1998).

As trocas genéticas dão-se entre células bacterianas recetoras que recebem no citoplasma um fragmento de DNA da célula dadora, através do processo de recombinação homóloga, e dá-se a troca de material genético. Para beneficiarem da transferência de genes as bactérias desenvolveram três mecanismos: transformação, transdução e conjugação, como exemplificado na figura 6 (Ferreira, et al., 1998).



**Figura 6: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de troca genética entre bactérias:**

**A- Transformação, B- Transdução e C- Conjugação (adaptado de Pereira, 2011)**

- **Transformação**

A transformação habitualmente só acontece entre bactérias da mesma espécie. Este mecanismo consiste na captação, por uma bactéria recetora, do DNA proveniente do cromossoma ou do plasmídeo libertado por outra bactéria por transferência horizontal. Em condições naturais, a transformação acontece quando a bactéria lisa e o seu DNA é captado pela bactéria recetora (Ferreira, et al., 1998).

- **Transdução**

A transferência de genes entre bactérias pode ser mediada por bacteriófagos. Pode ser transdução generalizada, que está associada ao ciclo vegetativo dos bacteriófagos, DNA e qualquer genes do genoma podem ser transferidos para outra bactéria. Também pode ser transdução restrita se neste caso só um pequeno grupo de genes é que é transferido, está associada ao ciclo lisogénico dos bacteriófagos (Ferreira, et al., 1998).

- **Conjugação**

Este mecanismo de transferência horizontal de uma bactéria viável para outra é mediado pelas fímbrias sexuais ou pilus F (*pili*). A conjugação inicia-se pela fixação da fímbria sexual da bactéria dadora a recetores específicos na parede da bactéria recetora. Assim são estabelecidas conexões citoplasmáticas entre as bactérias conjugantes. A transferência do material genético ocorre com a quebra do DNA do plasmídeo da bactéria dadora, que é passado para a recetora através das fímbrias. A bactéria recetora passa a expressar as características codificadas do plasmídeo recebido, o qual é transferido pelas novas gerações de bactérias (Ferreira, et al., 1998).

Na ausência do *pili*, o contacto com a célula bacteriana é feito através de proteínas denominadas adesinas. O *pili* é parte da bactéria dadora que possui um plasmídeo responsável pela resistência conferida à célula recetora. O plasmídeo é replicado na bactéria dadora e a sua cópia, que é um filamento simples de DNA, é transferida para a bactéria recetora formando uma célula filha. A célula filha pode então incorporar o plasmídeo no seu cromossoma e iniciar um processo de recombinação genética (Ferreira, et al., 1998).

## 5. BACTERIAS MAIS COMUNS EM ISOLADOS DE EXPETORAÇÕES

### 5.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (também conhecida como *Pseudomonas pyocyanea*) é uma bactéria Gram-negativa oportunista, aeróbio obrigatório, baciliforme, cresce até 42°C, móveis com flagelos polares (Figura 7), glucose não-fermentadora, oxidase positiva, produz piocianina (pigmento azul e fluorescente), os quais dão às colónias e aos ferimentos infectados uma coloração verde-azulada (Ferreira, et al., 2000).

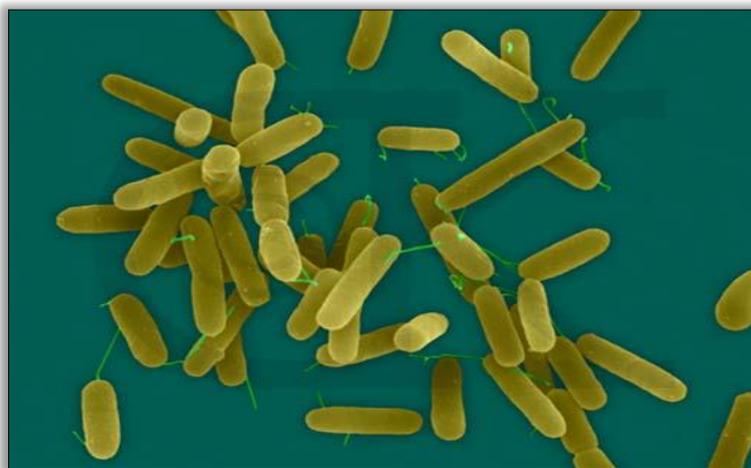


Figura 7: *Pseudomonas aeruginosa* (adaptado de Winsor GL, 2011).

Produz um odor doce a uvas o que permite ajudar na sua identificação. O ambiente de origem é o solo, mas é capaz de viver em ambientes hostis (Gladwin, et al., 2002).

Muitas das infeções por *Pseudomonas aeruginosa* são nosocomiais, podem surgir após algaliação, infeções nos pulmões por contaminação dos ventiladores e em doentes debilitados ou com feridas, mesmo quando já com antibioterapia. Uma vez estabelecida é muito virulenta, pois produz toxinas, hemolisinas e protéases que libertam para o meio circundante, danificando tecidos e destruindo as defesas imunitárias do hospedeiro (Ferreira, et al., 2000).

A partir de 1991 surgiram as primeiras infeções hospitalares por estirpes multirresistentes sensíveis apenas à Colistina. A elevada frequência no ambiente hospitalar explica-se parcialmente pela sua resistência a antibióticos e antisépticos leves (Arruda, 1998).

Uma característica da *Pseudomonas aeruginosa* é a resistência a diversos tipos de antibióticos, seja ela intrínseca ou adquirida. A resistência apresentada por estes microrganismos é principalmente devido a baixa permeabilidade da membrana externa e aos sistemas de efluxo (Ferreira, et al., 1998).

Os principais antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* são alguns  $\beta$ -lactâmicos, tais como: penicilinas (Piperacilina, Ticarcilina), cefalosporinas de 3ª geração (Cefotaxima, Ceftazidima), Imipenem, Meropenem e Aztreonam. É também sensível á Ciprofloxacina e aos aminoglicosídeos (Gentamicina, Tobramicina e Amicacina) (Ferreira, et al., 2000). Tem resistência intrínseca á Bacitracina, Vancomicina e Teicoplanina, O uso sistemático de cefalosporinas de 3º geração, conduziu ao aparecimento de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), estas  $\beta$ -lactamases conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto os carbapenemos (Sousa, 2006).

No entanto uma alteração na porina específica da membrana externa de *P. aeruginosa*, pela qual o Imipenem geralmente se difunde, pode excluir o antimicrobiano de seu alvo, tornando estirpes de *P. aeruginosa* resistentes ao Imipenem (Ferreira, et al., 2000).

Apresenta resistência plasmídica á Fosfomicina, atribuída ao gene *fosA*, um polipeptídeo que catalisa a adição de fosfocina a glutatona, formando um complexo inativo (Sousa, 2006).

## 5.2. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, encapsulada, aeróbia-anaeróbia facultativa em forma de bastonete, imóvel, fermentadora da glicose e da lactose, reduz os nitratos a nitritos, catalase positiva e oxidase negativa, encontrada na flora normal da boca, da pele e nos intestinos. É o mais importante membro do género *Klebsiella* e importante membro da Família das Enterobactérias. É facilmente reconhecida pelas suas colónias grandes e mucoides que crescem na Gelose MacConkey (Figura 8) (Ferreira, et al., 2000).



**Figura 8:** Colónias de *Klebsiella pneumoniae* na Gelose MacConkey (adaptado de Wikipedia,2012).

Pode causar pneumonia embora seja mais comum a sua implicação em infeções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular em doentes imunologicamente deprimidos, em viciados em álcool, 50% são predispostos a pneumonia com expetoração hemática. A taxa de mortalidade é elevada apesar da terapia antimicrobiana (Gladwin, et al., 2002).

*Klebsiella pneumoniae* com a capacidade de produzir beta-lactamases de espectro estendido denomina-se *K. pneumoniae* carbapenemase 1 ou KPC-1 (Yigit, et al., 2001).

O aparecimento de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à mais recente classe de antibióticos conhecidos como Carbapenemos (Imipenem e Meropenem), deu-se por estas desenvolverem mecanismos de resistência a uma enzima  $\beta$ -lactamase, conhecida como uma carbapenemase. É uma enzima produzida por enterobactérias e a sua deteção confere resistência aos antimicrobianos Carbapenemos, além de inativar Penicilinas, Cefalosporinas e Monobactamos. São conhecidas por *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistente (CRKP). São vários os mecanismos de resistência que podem impedir a ação dos carbapenemos e a resistência surge, ocasionalmente, da combinação de impermeabilidade da membrana com  $\beta$ -lactamases cromossómicas (AmpC) ou de amplo espectro (ESBL) (Dienstmann, et al., 2010).

Nos EUA, CRKP foi descrita pela primeira vez na Carolina do Norte em 1996 (Yigit, et al., 2001).

CRKP é resistente a quase todos os agentes antimicrobianos disponíveis e infeções com CRKP causam altas taxas de morbidade e mortalidade, particularmente entre pessoas com hospitalização prolongada e aqueles que estão gravemente doentes e expostos a

dispositivos invasivos (por exemplo, ventiladores ou cateteres venosos centrais). Os pacientes com infecções por CRKP podem ser reservatórios para a transmissão durante surtos nosocomiais. A preocupação é que as novas mutações resistentes podem resultar em infecções para as quais há muito pouco tempo havia antimicrobianos sensíveis (Yigit, et al., 2001).

Os carbapenemos, tais como o Imipenem o Meropenem, têm sido usados com maior frequência para o tratamento de bactérias multirresistentes Gram-negativas nosocomiais.

A resistência a carbapenemos não é comum nas bactérias entéricas, no entanto esta resistência pode desenvolver-se através de três mecanismos conhecidos (Yigit, et al., 2001):

Primeiro, a alta produção da enzima AmpC, combinada com a diminuição da permeabilidade da membrana, através da perda ou alteração das porinas, pode resultar em resistência a carbapenemos. O segundo mecanismo é a produção de  $\beta$ -lactamases com a capacidade de hidrolisar carbapenemos. O terceiro mecanismo de resistência envolve a mudança de afinidade nas enzimas alvo, a penicilina liga-se a proteínas específicas para carbapenemos.

As resistências mais frequentes incluem a resistência a  $\beta$ -lactâmicos (Penicilinas, Carbapenemos), Aminoglicosídeos, Quinolonas, Tetraciclina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol-trimetoprim e Cefalosporinas (Sousa, 2006)

### 5.3. *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes

O género *Staphylococcus* engloba todos os cocos Gram-positivos, catalase positiva, que se agrupam em cacho (Figura 9), no entanto, nos produtos biológicos podem ser observados cocos isolados, dois a dois ou em curtas cadeias, definem-se por serem anaeróbios facultativos, mas podem viver em meios aeróbios usando oxigénio ou anaeróbios através de fermentação, crescem bem em meio salino, não têm flagelos, são capsulados e só uma espécie produz uma enzima importante, a coagulase, o *Staphylococcus aureus* é coagulase positiva e cresce rapidamente em ambiente aeróbio (Ferreira, et al., 2000).



**Figura 9:** Fotografia de *Staphylococcus aureus* em microscópio eletrônico (adaptado de CDC, 2009).

*Staphylococcus* spp existem na pele de todas as pessoas sem causar doença, geralmente são estirpes pouco virulentas. Por vezes também existem nas mucosas, na boca, no intestino, no aparelho génito-urinário e no aparelho respiratório superior (Balows, et al., 1991), existem com maior densidade nas regiões da pele com mais glândulas sudoríparas e folículos pilosos e nas áreas mais próximas dos orifícios naturais do corpo (Ferreira, et al., 2000).

Cerca de 20 a 40% da população saudável é portadora nasal de *Staphylococcus aureus* (Ferreira, et al., 2000).

Estafilococos são destruídos por desinfetantes, sabão e altas temperaturas. Resistem bem à desidratação durante longos períodos através de materiais inanimados (p. ex. roupa contaminada, roupa de cama). Por isso, todos os profissionais de saúde e as pessoas que cuidam de doentes devem usar as técnicas de lavagem recomendadas das mãos que previnam a transferência de espécies de *Staphylococcus*, deles para os doentes ou entre os doentes (Murray, et al., 2009).

As estirpes de *S. aureus* são as mais encontradas em infeções comunitárias e nosocomiais e as doenças causadas devido à invasão e lesão dos tecidos por toxinas. São causadoras do Síndrome do choque tóxico, de intoxicação alimentar e do Síndrome da pele escaldada, por enzimas (lípase, catalase ou coagulase) ou por outros fatores de virulência, tais como a cápsula que inibe a fagocitose, a composição da parede celular que tem mucopéptido e proteína A, que inibe a fagocitose e a ação dos antibióticos (Ferreira, et al., 2000).

O género *Staphylococcus aureus* possui cinco PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa final da síntese da parede bacteriana e localizam-se na membrana celular

da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a estes por ligações covalentes (Souza, et al., 2005).

As infecções por *S. aureus* são classicamente tratadas com Penicilinas (Oxacilina ou Meticilina) ou com Cefalosporinas de 1ª geração (Cefalotina, Cefazolina), no entanto infecções provocadas por estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases, são tratadas com Dicloxacilina ou Amoxicilina+Ácido clavulânico (Ferreira, et al., 2000).

Em finais dos anos 50, a estirpe *Staphylococcus aureus* foi a causa de numerosas infecções nosocomiais, causando grande mortalidade e morbidade, que baixou significativamente com o uso da penicilina, contudo surgiram estirpes resistentes á penicilina, devido à síntese de  $\beta$ -lactamases.

O uso da Meticilina conteve estas estirpes, mas, novamente adquiriram resistência à Meticilina com a aquisição do gene *mecA*, este gene codifica para uma PBP mutada, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com o local de ligação da Meticilina e compostos penicilina-penicilinase resistente (PPR) e que é responsável pela resistência intrínseca dos MRSA a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2006), (Ferreira, et al., 2000).

O grupo PPR é composto pelas drogas oxacilina, meticilina, cloxacilina e dicloxacilina. A oxacilina é a droga representativa deste grupo das PPR e a sua resistência prediz resistência a todos as PPR e a todos os  $\beta$ -lactâmicos independentemente do resultado do antibiograma (Souza, et al., 2005).

São estas as estirpes hoje conhecidas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes ou MRSA (Ferreira, et al., 2000). O MRSA não é mais agressivo do que os *Staphylococcus aureus* meticilino-sensíveis (MSSA). O grande problema está nas reduzidas opções de tratamento e não na virulência da mesma, uma vez que é resistente a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e com alta resistência a Aminoglicosídeos, Macrolídeos e Tetraciclina (Ferreira, et al., 2000).

As estirpes de *Staphylococcus aureus* possuem três mecanismos distintos de resistência à Meticilina que pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídeos (Souza, et al., 2005):

- 1- Hiperprodução de  $\beta$ -lactamases;
- 2- Presença de uma PBP alterada denominada PBP 2a
- 3- Modificações na capacidade de ligação das PBPs

Alguns estudos sugerem que os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si (Souza, et al., 2005).

O tratamento das estirpes de MRSA é feito com Vancomicina, Linezolide ou Teicoplanina. Uma vez mais, desenvolveram-se estirpes de *Staphylococcus aureus* com resistência intermédia à Vancomicina (VISA) e mais recentemente com resistência à Vancomicina (VRSA) (Hageman, et al., 2006).

Este mecanismo de resistência está associado a uma ativação da síntese da parede celular, mediada pela presença do gene VanA, proveniente da transferência de material genético do *Enterococcus faecalis* para o *Staphylococcus aureus* (Souza, et al., 2005).

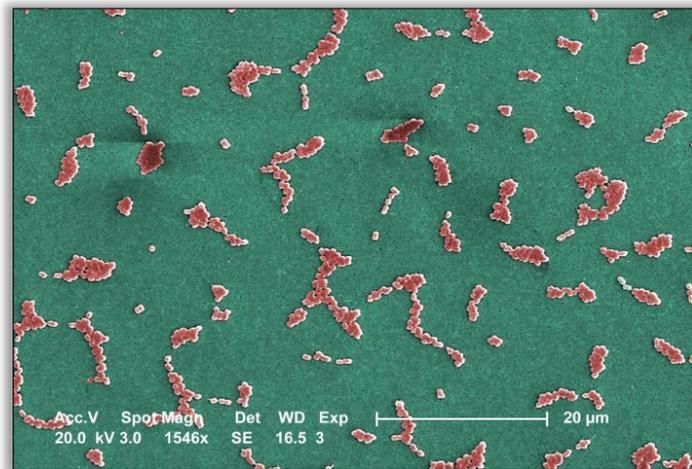
Em consequência da elevada produção de componentes da parede celular (resíduos de mucopéptideo), ocorre hiperprodução das PBP2 e PBP2', espessamento da parede celular e redução da quantidade de antibiótico que chega ao seu local de ação (membrana citoplasmática) (Souza, et al., 2005).

De acordo com as últimas recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), o resultado obtido do teste *in vitro* para a Vancomicina está no valor da Concentração Mínima Inibitória (MIC), assim, para  $MIC \leq 2\mu\text{g/ml}$  é Vancomicina sensível, para MIC entre 4-8 $\mu\text{g/ml}$  é resistência intermédia para Vancomicina e com o resultado de  $MIC \geq 16\mu\text{g/ml}$  é resistente à Vancomicina (Hageman, et al., 2006).

Novos antibióticos foram desenvolvidos como alternativas ao tratamento de VRSA, como Linezolide, Daptomicina, Tigeciclina e Quinupristina-Dalfopristina (Hageman, et al., 2006).

#### 5.4. *Acinetobacter* spp

*Acinetobacter* spp é um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, não fermentador da lactose, oxidase negativa, imóvel, não fastidioso (figura 10) (Ferreira, et al., 2000).



**Figura 10:** Imagem de *Acinetobacter* spp em microscopia eletrônica (adaptado de CDC, 2010).

Faz parte da flora normal da pele e do sistema digestivo em indivíduos saudáveis, têm sido isolados a partir do solo, da água e do ambiente hospitalar tal como em bancadas, aparelhos de raios X, em ventiladores e em sistemas de circulação de ar, tendo a capacidade de sobreviver tanto em ambientes secos como húmidos (Murray, et al., 2009).

É um microrganismo oportunista, capaz de causar graves surtos de infeções nosocomiais, têm sido isolados a partir do trato respiratório e garganta de indivíduos hospitalizados, embora na comunidade as taxas de colonização e infeção sejam relativamente baixas. Esta bactéria tem sido descrita com responsável por causar meningite, septicémia fulminante, infeções pulmonares e oftálmicas, doenças da pele e infeções de feridas. Tem ganho importância nos últimos anos devido à maior participação em infeções graves e à resistência aos antimicrobianos (Ferreira, et al., 2000).

A espécie *Acinetobacter* spp pode sobreviver na pele humana ou superfícies secas durante semanas e entra no corpo humano através de feridas abertas, sendo que em ambiente hospitalar as vias mais comuns são os cateteres, as sondas nasogástricas e a intubação endotraqueal. Sendo uma bactéria oportunista, em geral infeta apenas indivíduos

com sistema imunitário comprometido, como os feridos com gravidade, os idosos, as crianças e os portadores de doenças que deprimem o sistema imunitário (Drosos, et al., 2008).

O número de infeções hospitalares causadas por *A. baumannii* aumentou nos anos mais recentes, seguindo uma tendência de aumento da incidência comum à maioria das infeções causadas por MRSA, VRSA e VRE (Drosos, et al., 2008).

As contaminações por estirpes multirresistentes de *A. baumannii* são na atualidade um problema comum nos hospitais das regiões mais desenvolvidas do mundo, com destaque para a América do Norte e a Europa. Causam nos seres humanos uma ampla variedade de quadros infecciosos, razão pela qual a bactéria é considerada um importante agente patogénico afetando feridos, nomeadamente os feridos de guerra e vítimas de politraumatismo, nos quais provoca infeções graves, frequentemente fatais (Drosos, et al., 2008) (Elston, et al., 2008).

Foi observado que após o regresso de soldados Norte Americanos do Iraque em 2005, aquando a evacuação das forças armadas, 280 soldados vinham infetados com a bactéria *Acinetobacter baumannii*, destes a maior parte veio dos campos de batalha e pelo menos 5 destes soldados morreram com bactérias contraídas por exposição de feridas abertas em contacto com o solo contaminado (Elston, et al., 2008).

Um crescimento dramático e vertiginoso na resistência a antibióticos na estirpe de *Acinetobacter baumannii* vem sendo sistematicamente relatado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Elston, et al., 2008) (CDC, 2010).

As espécies de *Acinetobacter* são por natureza resistentes a muitos grupos de antibióticos, incluindo Penicilina, Cloranfenicol e frequentemente a Aminoglicosídeos. Os Carbapenemos são reconhecidos como o tratamento padrão de última escolha (CDC, 2010) (Drosos, et al., 2008).

Esta bactéria é altamente resistente aos antibióticos. Recomenda-se o tratamento com Cefalosporinas de 3ª geração, Imipenem e Aminoglicosídeos, no entanto já existem estirpes resistentes ao Imipenem, pela produção de carbapenemases (Ferreira, et al., 2000). Outras opções de tratamento incluem Polimixinas (Colistina), Tetraciclinas (Monociclinas) (Drosos, et al., 2008).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana frequentemente encontrados nesta bactéria incluem: produção de  $\beta$ -lactamases, bombas de efluxo, redução da permeabilidade da membrana externa, alteração dos alvos dos antibióticos (por exemplo, das Quinolonas) e produção de enzimas de inativação de Aminoglicosídeos (Drosos, et al., 2008).

Dados clínicos, a sua maioria derivados de pequenos estudos, mostram resultados clínicos favoráveis, que indicam atividade antimicrobiana confiável das Polimixinas contra *Acinetobacter baumannii* com ampla resistência a drogas. Evidências pré-clínicas sugerem que a Monociclina e a Colistina é altamente eficaz contra *Acinetobacter baumannii* (Drosos, et al., 2008).

## 6. EXPETORAÇÃO

### 6.1. Fisiologia da expetoração

O exame do aparelho respiratório fornece importantes informações para o diagnóstico, utilizando para tal, as técnicas básicas do método clínico: inspeção, palpação, percussão e auscultação. Normalmente limitado à caixa torácica, o exame físico do aparelho respiratório deve estender-se à análise do material eliminado através das vias respiratórias. Este método é extremamente útil no diagnóstico diferencial das doenças pulmonares, bem como dos agentes etiológicos das doenças infecciosas (Silva, 2004).

As secreções traqueobrônquicas são uma mistura inconstante de plasma, água, eletrólitos e mucina. Apesar de se inalar elevadas quantidades de microrganismos viáveis, as vias respiratórias baixas mantêm-se virtualmente estéreis. À medida que as secreções atravessam as vias respiratórias inferiores e superiores contaminam-se com exfoliantes celulares do epitélio de superfície, com secreções nasofaríngeas e das glândulas salivares e com flora bacteriana normal da boca. Com o adequado estímulo imunológico ou inflamatório os mastócitos, eosinófilos, células plasmáticas e bactérias podem contribuir para as secreções (Todd, 1988).

Situações que causam aumento da produção do muco e alterações das suas propriedades, desencadeiam mecanismos de defesa do aparelho respiratório responsáveis pela sintomatologia descrita como tosse. A tosse pode ser produtiva ou improdutiva. Na tosse produtiva, quantidades variáveis de secreções formadas ou depositadas nas vias aéreas são eliminadas. As infeções bacterianas como as pneumonias, causam produção de expetoração no início insidioso, no entanto, aumentando gradualmente de volume, num período de dias a semanas (Silva, 2004).

A esta mistura de secreções e partículas dá-se o nome de expetoração.

Hipócrates no Séc. I a.C. foi o primeiro a demonstrar a utilidade do estudo da expetoração, observando a cor, o odor e o aspeto das amostras para o diagnóstico e tratamento dos doentes (Todd, 1988).

As características da expetoração mudam de acordo com a doença respiratória, alterando a cor, a viscosidade e o odor.

A viscosidade encontra-se particularmente aumentada nos casos de infeção do trato respiratório, seja ela bacteriana, micobacteriana ou fúngica. A presença de piócitos

caracteriza a expetoração do tipo purulento. Macroscopicamente apresenta-se como secreção extremamente viscosa, amarelada ou esverdeada. A infecção bacteriana é o maior exemplo de expetoração purulenta (Silva, 2004).

O odor também é uma característica semiológica importante, sendo a fetidez associada ao abscesso pulmonar por anaeróbios (Silva, 2004).

Diferenças na coloração podem sugerir agentes etiológicos específicos. Na pneumonia pneumocócica a expetoração é tipicamente ferruginosa. Quando a bactéria é *Klebsiella pneumoniae*, assume coloração arroxeadada, semelhante à geleia de framboesa. Quando a bactéria é *Pseudomonas aeruginosa* confere um aspeto esverdeado à secreção eliminada (Silva, 2004).

A tosse aguda pós-infeciosa é um sinal de pneumonia. Na maioria dos casos, outros sinais e sintomas estão presentes, porém, nos idosos, necessita-se de alto índice de suspeição clínica já que muitas vezes febre, dor torácica e calafrios estão ausentes. A presença de tosse, alteração do comportamento e anormalidade no exame físico do tórax deve sempre levar à suspeita e início de antibioterapia, após um RX do tórax sugestivo (Todd, 1988).

## 6.2. Exame direto da expetoração

Para avaliar se a amostra de expetoração é válida para ser cultivada é preciso realizar o seu estudo microscópico.

Qualquer bactéria presente na expetoração assim como as células observam-se melhor mediante o exame da amostra estendida em lâmina (esfregaço bacteriano), que depois de seco e fixado por chama é corado pelo método de Coloração de Gram (Anexo 1).

Depois da amostra numerada efetuam-se 3 esfregaços para coloração de Gram, coram-se dois esfregaços e guarda-se um.

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona, enquanto as paredes celulares de bactérias Gram negativas não o fazem. A retenção ou não do corante primário é, portanto, dependente das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas tais como espessura, densidade, porosidade e integridade (Ferreira, et al., 1998).

O solvente dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias Gram-negativas e o complexo cristal violeta-iodo é removido, descorando as células. Por outro lado, o solvente desidrata as espessas paredes celulares das bactérias Gram positivas e provoca a contração dos poros do peptidoglicano, tornando-as impermeáveis ao complexo cristal violeta-iodo, o corante primário é retido e as células permanecem coradas. Em seguida, a amostra é tratada com um corante secundário, a fucsina básica.

Ao microscópio, as bactérias que adquirem a coloração azul violeta, são chamadas de **Gram-positivas**. As que adquirem a coloração vermelha, são chamadas de **Gram-negativas** (Ferreira, et al., 1998).

Numa expetoração se após a observação microscópica dos esfregaços bacterianos corados, forem observadas menos de 10 células epiteliais escamosas por campo e mais de 25 leucócitos polimorfonucleares por campo, a amostra é válida para ser cultivada (Tabela 1) (Murray, et al., 1975).

**Tabela 1: Critérios de validação de amostras de expetoração (adaptado de Murray, et al., 1975)**

Grupo	Nº células por campo (x10)		Realizar cultivo
	Células epiteliais Escamosas	Leucócitos polimorfonucleares	
1	25	10	Não
2	25	10-25	Não
3	25	25	Não
4	10-25	25	Não
5	<10	>25	Sim

Na observação microscópica do esfregaço bacteriano, é necessário também considerar o tipo de flora bacteriana predominante, cocos, bacilos, cocobacilos ou até fungos.

No caso de se observar muita quantidade de células inflamatórias, suspeita-se da presença de bactérias patogénicas e procede-se ao cultivo da amostra de expetoração (Silva R., 2004).

## 7. OBJETIVOS

O diagnóstico etiológico das infeções respiratórias é muitas vezes difícil de estabelecer, devido à fraca sensibilidade e especificidade dos métodos laboratoriais utilizados (Murray, et al., 2009).

As culturas de expetoração apresentam resultados bastante variáveis, apresentando-se positivas entre 20-79% dos casos e nos estudos portugueses, positivas em 12.6% e 18.2% dos casos em dois estudos encontrados (Marques, et al., 2005).

Todos os estudos até hoje efetuados demonstram que os custos, quer diretos quer indiretos associados às infeções hospitalares são consideráveis e contribuem para as dificuldades financeiras da área dos cuidados de saúde. Este é um dos argumentos que justificam a implementação de um programa de vigilância e controlo da infeção nosocomial (Marques, et al., 2005).

Atentos à situação, e tendo em conta a incidência destes diagnósticos, foi efetuado um estudo retróspetivo da sensibilidade antimicrobiana das estirpes mais isoladas em exames bacteriológicos e culturais de expetoração, provenientes do Serviço de Medicina Interna do Hospital Visconde de Salreu (HVS).

Este estudo irá dar continuidade a um outro estudo realizado em 2006, para apresentação de um póster nas VII Jornadas de Patologia Clínica do CHAM, EPE em 28 de abril de 2006, este estudo consistiu em conhecer o perfil antimicrobiano das estirpes mais isoladas de expetorações em meio hospitalar e extra-hospitalar nos anos de 2000 a 2005. Achou-se por isso pertinente continuar o estudo de modo a proporcionar ao HVS mais uma ferramenta de trabalho na luta contra as infeções.

Deste modo, constituíram objetivos deste estudo:

- Efetuar um estudo retrospectivo dos anos de 2006 a 2010, sobre o perfil de sensibilidade dos microrganismos mais isolados de expetorações.
- Comparar os resultados obtidos, com os resultados de um estudo semelhante realizado em 2006.
- Comparar o consumo de antibióticos no Serviço de Medicina Interna, com os resultados dos Testes de Sensibilidades aos Antimicrobianos (TSA).

## 8. MATERIAL

- **Caracterização da unidade hospitalar e do serviço de patologia clínica**

O Hospital Visconde de Salreu (HVS) tem como valências os serviços de internamento, num total de 50 camas, distribuídas pelos serviços de Cirurgia, Medicina e Ortopedia. Possui ainda Bloco operatório, Farmácia, Patologia Clínica, Imagiologia, Consulta Externa e Apoio Domiciliário.

A consulta externa possui as especialidades de anestesiologia, cirurgia geral, dor, ginecologia, hipertensão arterial, imunoalergologia, medicina interna, medicina física e reabilitação, medicina do trabalho, oftalmologia, ortopedia, otorrinolaringologia, patologia clínica e pneumologia.

O Serviço de Patologia Clínica do HVS é composto por 4 setores: hematologia, bioquímica, microbiologia e imunologia/endocrinologia.

O funcionamento destes setores é assegurado por um quadro constituído por uma médica patologista, chefe de serviço, por uma técnica superior, por duas técnicas de diagnóstico e terapêutica e por uma administrativa. Este serviço funciona das 8 às 17h de segunda a sexta-feira.

- **Período do estudo**

Realizou-se um estudo retróspetivo dos anos de 2006 a 2010, com pedidos de cultura de secreções respiratórias provenientes do meio hospitalar (serviço de medicina interna). Todos os dados dos utentes, testes efetuados e resultados obtidos estão registados no Mod.23 (Registo bacteriológico de expetorações). Em todos os casos registou-se: idade, género e o resultado do exame cultural com identificação da(s) estirpe(s) bacteriana(s) e com o TSA.

- **Crítérios de Exclusão dos pedidos**

Foram excluídos os pedidos de exames bacteriológicos e culturais de expetoração com período igual ou inferior a 8 dias, relativamente ao último pedido.

## 9. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Todos os procedimentos laboratoriais existentes no serviço de patologia clínica do HVS estão de acordo com o Manual da Qualidade existente no laboratório.

### 9.1. Fase pré- analítica

Após a colheita das secreções respiratórias no Serviço de Medicina Interna, de acordo com o “Manual de Colheitas”, as amostras são enviadas para a secretaria da patologia clínica que após confirmação da identificação das amostras com os pedidos de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados pelo clínico é feito o registo do pedido no programa informático “Sonho” e é atribuído o nº interno do laboratório registado no MOD. 23.

### 9.2. Fase analítica

Executado de acordo com PO.17-Exame bacteriológico de expetoração (Anexo 2). Após a validação da amostra de expetoração procede-se ao seu cultivo. Semeia-se pela técnica de esgotamento por quadrantes com uma ansa esterilizada de 10µl, nos seguintes meios de cultura:

- **Gelose Columbia + 5% sangue de carneiro** (Ref<sup>a</sup>.43041 bioMérieux<sup>®</sup>).

Meio que contém uma mistura de peptonas que facilita o crescimento de microrganismos fastidiosos e a presença de sangue permite detetar a β-hemólise e α-hemólise. Incuba em O<sub>2</sub> a 37°C durante 18 a 24h (bioMerieux, 2003).

A gelose de sangue pode ser usada para realizar subculturas de estirpes de modo a obter culturas puras.

- **Gelose Mac Conkey** (Ref<sup>a</sup>.43141 bioMérieux<sup>®</sup>).

O meio contém ácido biliar que inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas (exceto *Enterococcus* e algumas espécies de *Staphylococcus*), cristal violeta (inibidor para algumas bactérias Gram positivas) e vermelho neutro (cora bactérias fermentadores de lactose), lactose e peptídeo. Classifica as bactérias em **Lac+**, e **Lac-**, conforme sejam ou não fermentadoras da lactose (bioMerieux, 2003).

Bactérias fermentadoras de lactose (*Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) utilizam a lactose disponível no meio e produzem ácido como produto final. Este ácido diminui o pH do meio para valores inferiores a 6,8, resultando na observação de colónias rosa choque/vermelhas: **Lac+**.

Bactérias que não fermentam a lactose (*Salmonella*, Espécies *Proteus* e *Shigella*) não conseguem utilizar a lactose e utilizam a peptona. Isto forma amónia, que eleva o pH do ágar, levando à formação de colónias brancas/sem cor: **Lac-**.

Incuba em O<sub>2</sub> a 37°C durante 18 a 24h.

- **Gelose Chapman 2** (Ref<sup>a</sup>.43671 bioMérieux<sup>®</sup>).

Também conhecido por Mannitol Salt, meio seletivo com elevado teor de NaCl e vermelho de fenol, como indicador de pH, inibindo o crescimento da maioria das bactérias. Incuba em O<sub>2</sub> a 37°C durante 18 a 24h (bioMerieux, 2003).

Microrganismos que fermentam o manitol, acidificam o meio e as colónias apresentam cor amarela, este critério identifica *Staphylococcus aureus*.

As bactérias que não fermentam o manitol pois utilizam as peptonas do meio para o seu metabolismo, alcalinizam o meio e as colónias apresentam cor rosa/vermelho.

- **Gelose Chocolate PolyVitex** (Ref<sup>a</sup>. 43101 bioMérieux<sup>®</sup>).

Meio não seletivo enriquecido com hemina - fator X (proveniente dos glóbulos vermelhos lisados) e NAD - fator V. É utilizado para o crescimento de estirpes fastidiosas do género *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus pneumoniae*.

Este meio pode ser usado para subcultivar estirpes bacterianas de modo a obter culturas puras. Incuba em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>, a 37°C durante 18 a 24h (bioMerieux, 2003).

Após a adequada incubação e de acordo com a observação das placas dos meios de cultura, há três possíveis procedimentos a executar:

- Quando não há desenvolvimento bacteriano ou este é insignificante, o exame cultural é considerado negativo.
- Quando existe mais que um tipo de colónias, valorizam-se as colónias que estão em maior quantidade e com as mesmas características morfológicas (cor, tamanho e

aspeto). Procede-se ao isolamento dos microrganismos por repicagem, para obtenção de culturas puras. Após a obtenção de culturas puras, faz-se de uma colónia um esfregaço que depois de seco e fixado pela chama é corado pela coloração de Gram. Procede-se à sua identificação e respetivo antibiograma.

- Quando se desenvolveu uma cultura pura, de uma colónia faz-se um esfregaço que depois de seco e fixado pela chama é corado pela coloração de Gram. Procede-se à sua identificação e respetivo antibiograma.

#### ✓ **Identificação dos isolados bacterianos:**

Para além da coloração de Gram, realizam-se outras técnicas específicas para a identificação das bactérias, tais como:

- **Catalase** (Ref<sup>a</sup>.55 561 bioMérieux<sup>®</sup>).

A presença de catalase é detetada nos microrganismos por uma libertação de O<sub>2</sub> a partir de água oxigenada. A presença de um agente espessante e de um corante facilitam a observação da emissão gasosa (Anexo 3 – PO.48).

Distingue *Staphylococcus* que são catalase positiva, de *Streptococcus* que são catalase negativa.

- **Oxidase** (Ref<sup>a</sup>.55 635 bioMérieux<sup>®</sup>).

Teste diferencial na identificação das bactérias Gram negativas que usam a enzima citocromo oxidase. O reagente da oxidase em contacto com as bactérias é oxidado ficando da cor roxa (bioMérieux, 2003).

*Pseudomonas* e *Neisseria* são oxidase positiva enquanto alguns *Enterobacteriaceae* são oxidase negativas (Gladwin, et al., 2002).

- **Sistema de identificação API:**

Foram usados os seguintes sistemas de identificação:

- **api<sup>®</sup> 20 E** (Ref<sup>a</sup>. 20 100 bioMérieux<sup>®</sup>). – Sistema padronizado de identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos (bioMérieux, 2003).

- **api<sup>®</sup> Staph** (Ref<sup>a</sup>. 20 500 bioMérieux<sup>®</sup>). – Sistema padronizado de identificação de estafilococos (bioMerieux, 2003).

O sistema de identificação API utiliza mini-testes bioquímicos padronizados que contêm substâncias desidratadas.

Os mini-tubos são inoculados com uma suspensão bacteriana, que reconstitui os meios. As reações produzidas durante o período de incubação de 24 horas traduzem-se pela mudança de cor espontânea ou revelada após a adição de reagentes.

A leitura das galerias API é efetuada de acordo com as reações químicas enzimáticas, sendo atribuído um código cuja leitura é feita no catálogo analítico API respetivo (bioMerieux, 2003).

#### ✓ **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

O teste da sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) é realizado de acordo com os antimicrobianos que normalmente são mais ativos para cada grupo ou espécie em estudo.

Essencialmente, o TSA define a actividade e a capacidade *in vitro* de um antibiótico para inibir o crescimento de uma bactéria ou população bacteriana (Anglada, 1997).

Foram utilizados os seguintes sistemas ATB:

- **ATB<sup>TM</sup> G - 5** (Ref<sup>a</sup>. 14 315 bioMérieux<sup>®</sup>).

Permite determinar a sensibilidade das *Enterobacteriaceae* aos antibióticos. Foi concebida segundo as recomendações do comité NCCLS (CLSI) 2000. (bioMerieux, 2003)

- **ATB<sup>®</sup> PSE 5** (Ref<sup>a</sup>.14 345 bioMérieux<sup>®</sup>).

Permite determinar a sensibilidade das *Pseudomonas* e outros bacilos Gram negativos não fermentadores aos antibióticos. Foi concebida segundo as recomendações do comité NCCLS (CLSI) 2000. (bioMerieux, 2003)

- **ATB<sup>TM</sup> STAPH 5** (Ref<sup>a</sup>. 14 325 bioMérieux<sup>®</sup>).

Permite determinar a sensibilidade dos *Staphylococcus* aos antibióticos. Foi concebida segundo as recomendações do comité NCCLS (CLSI) 2000 e do comité CA-SFM 1999. (bioMerieux, 2003)

As galerias ATB têm 16 pares cúpulas. O primeiro par sem antibiótico, serve como controlo de crescimento. Os 14 seguintes contêm antibióticos a uma ou duas concentrações. O último par sem antibiótico permite, se for necessário, adicionar um antibiótico complementar.

O microrganismo a testar é colocado em suspensão em meio de cultura, depois é inoculado na galeria. Após 18-24 horas de incubação, realiza-se a leitura visualmente.

A ausência de crescimento em pelo menos uma das cúpulas do controlo (designado por 0 no início da galeria ATB) invalida o antibiograma que deve ser novamente efetuado. Na leitura um crescimento limitado à periferia da cúpula deve ser lido como negativo. Observa-se em cada cúpula a existência ou não de turvação (bioMerieux, 2003).

O resultado é dado como, **S**- Sensível, **I**- Resistência Intermédia ou **R**- Resistente.

**Resistente:** Significa que a bactéria analisada apresenta resistência ao antibiótico utilizado e a eficácia da droga está comprometida, não exercendo efeito no controle da infeção. Este resultado é visto quando há turvação nas duas cúpulas, indicando que a bactéria conseguiu crescer no antibiótico pelo mesmo não causar efeito de inibição (Oplustil, et al., 2010).

**Intermédio:** Significa que a bactéria analisada apresenta resistência intermedia ao antibiótico utilizado na cúpula e a eficácia da droga é suspeita de estar comprometida, podendo não exercer efeito satisfatório no controle da(s) doença(s) (Oplustil, et al., 2010). Esse resultado é visto quando há turvação na 1ª cúpula e a 2ª cúpula não tem turvação.

**Sensível:** Significa que a bactéria analisada apresenta suscetibilidade ao antibiótico utilizado e é aconselhável a utilização do antibiótico para combater a doença causada pela bactéria analisada (Oplustil, et al., 2010).

Esse resultado é visto quando não há turvação nas cúpulas do antibiótico.

### **9.3. Fase pós-analítica**

Esta fase do processo refere-se à saída de resultados.

Quando não há desenvolvimento bacteriano ou este é insignificante, o resultado sai com a descrição da observação direta pela coloração de Gram e como exame cultural negativo.

Quando no exame bacteriológico e cultural de expetoração solicitado pelo clínico houve desenvolvimento bacteriano de uma ou mais estirpes e se procedeu à sua identificação e respetivo antibiograma então o resultado sai com a descrição da observação direta pela coloração de Gram e com a identificação da(s) bactéria(s) e respetivo(s) resultados do TSA.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Análise de dados

Todos os dados foram obtidos com a prévia autorização do Conselho de Administração do Hospital Visconde de Salreu (Anexo 4).

O tratamento dos dados foi efetuado através de Microsoft® Excel 2010.

Foram contabilizados todos os exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados, provenientes do serviço de Medicina Interna do HVS, dos anos de 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010. Todos os dados obtidos estão registados no Mod.23 (Registo bacteriológico de expetorações).

Em todos os pedidos está registado a idade, género, proveniência da amostra, resultado do exame cultural, resultado da observação do Gram, identificação da ou das estirpes bacterianas e o respetivo padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos com os resultados categorizados como sensíveis (S), resistência intermédia (I) e resistentes (R).

Os dados não foram diferenciados pela origem hospitalar ou comunitária das estirpes, uma vez que não foi possível precisar os locais de aquisição das infeções.

Os resultados obtidos foram analisados por ano, por escalão etário, por género e pelas estirpes bacterianas isoladas. Das quatro estirpes mais isoladas foram estudados os respetivos perfis de sensibilidades. Para simplificar os cálculos e por razões de prática clínica corrente, os isolados com perfis de resistência intermédia foram contabilizados como resistentes.

### 10.2. Amostras

Os resultados obtidos referem-se aos dados registados no Mod.23 (Registo bacteriológico de expetorações), nos anos de 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010.

Nestes cinco anos o número (nº) de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitado foi de 1135. Destes, um total de 904 exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados teve crescimento bacteriano.

Dos 1135 exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados, foi estudada a prevalência nos escalões etários e nestes subdivididos pelo género masculino e feminino, como pode ser observado na tabela 2.

**Tabela 2: Prevalência nos escalões etários, subdivididos pelo género masculino e feminino.**

	Género	% Exames bacteriológicos				
		2006 (n=184)	2007 (n=275)	2008 (n=258)	2009 (n=177)	2010 (n=241)
<20	Masculino	0	0	0	0	0
	Feminino	0	0	0	0	0
21-40	Masculino	0	2.1	1.5	10.1	0
	Feminino	0	0	1.5	2.9	0
41-60	Masculino	12.7	7.2	7.8	10.1	3.4
	Feminino	9.5	4.4	16.6	51.4	10.4
61-80	Masculino	59.0	48.5	63.2	50.7	65.5
	Feminino	58.1	47.0	53.9	51.4	24.0
>81	Masculino	28.2	42.0	27.3	28.9	31.0
	Feminino	32.4	48.5	42.1	45.5	65.6

Observou-se que no escalão etário <20 não foram solicitados exames.

Entre os 21-40 anos a percentagem (%) de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados no ano de 2009 é aproximadamente de 10% no género masculino.

No escalão etário 41-60, nos anos de 2006 e 2007 a % de exames solicitados é maior no género masculino, invertendo esta tendência nos três anos posteriores.

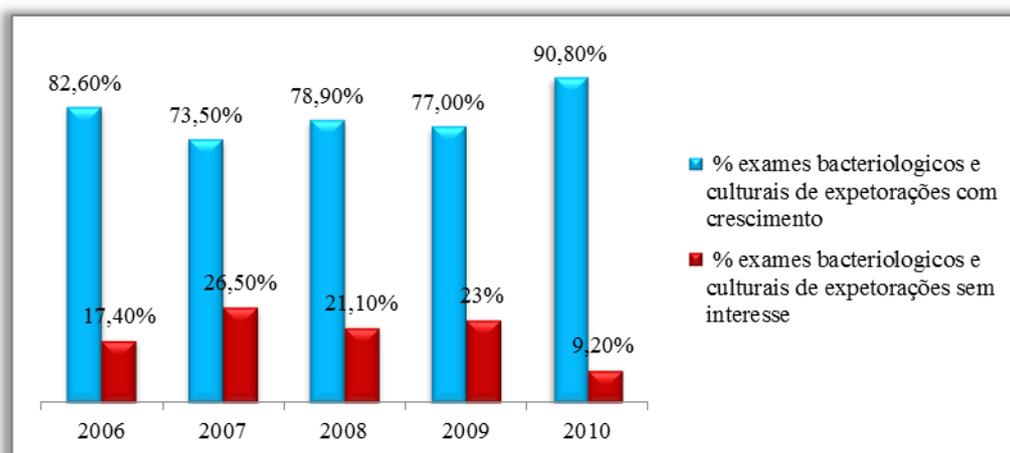
No escalão etário 61-80, a % de exames solicitados é maior no género masculino todos os anos, exceto no ano 2009, que é ligeiramente inferior.

No escalão etário >81 anos, verificou-se que a maior % de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados é de utentes do género feminino, estando estes dados de acordo com os dados provisórios obtidos pelos Censos 2011 do Instituto Nacional de

Estatística, em que a população portuguesa mais idosa é constituída maioritariamente por indivíduos do género feminino (Instituto Nacional de Estatística, 2011).

As características demográficas da população revelam que se agravou o envelhecimento da população na última década. Em 2010, Portugal tinha cerca de 19% da população com 65 ou mais anos de idade. A preponderância da população feminina é reforçada à medida que a idade avança. A sobremortalidade da população masculina e a menor esperança de vida à nascença dos homens relativamente às mulheres ajudam a explicar estes resultados. (Instituto Nacional de Estatística, 2011).

Ao longo destes cinco anos obteve-se a média de 80.5% de exames com crescimento bacteriano. O valor mais baixo foi obtido em 2007 com 73.5%, e o valor mais alto, em 2010 com 90.8% de exames com crescimento bacteriano (Figura 11).



**Figura 11: Percentagem de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados com crescimento bacteriano e sem interesse.**

A figura 12 representa a percentagem de todos os exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados com crescimento bacteriano, de todos os anos, desde 2006 a 2010, por escalões etários e por géneros.

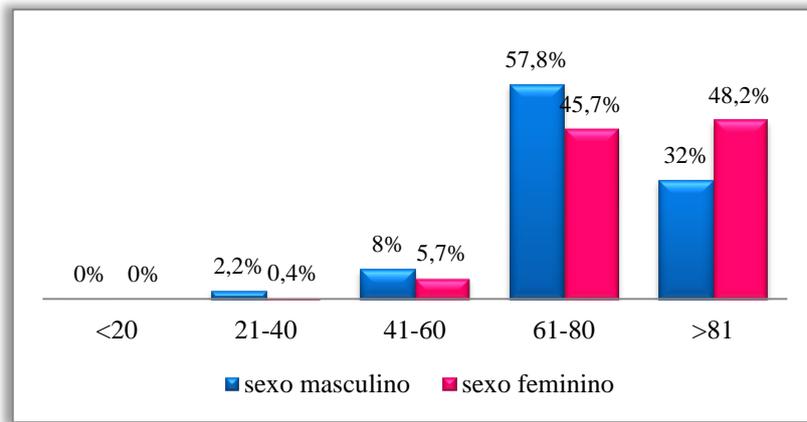


Figura 12: Percentagem de exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados com crescimento bacteriano, versus género, versus escalão etário.

### 10.3. Microrganismos isolados

De todos os 904 exames bacteriológicos e culturais de expetoração com crescimento bacteriano foram isoladas 1055 estirpes bacterianas.

A figura 13 esquematiza a distribuição anual das estirpes por percentagem de isolamentos.

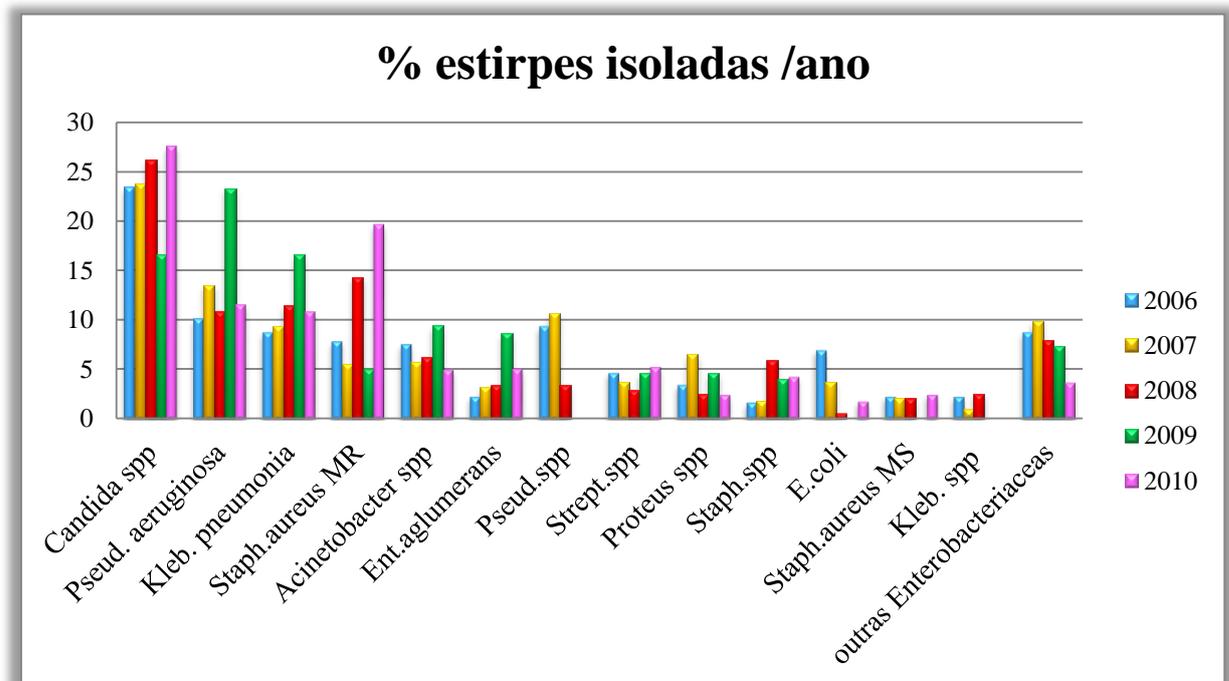


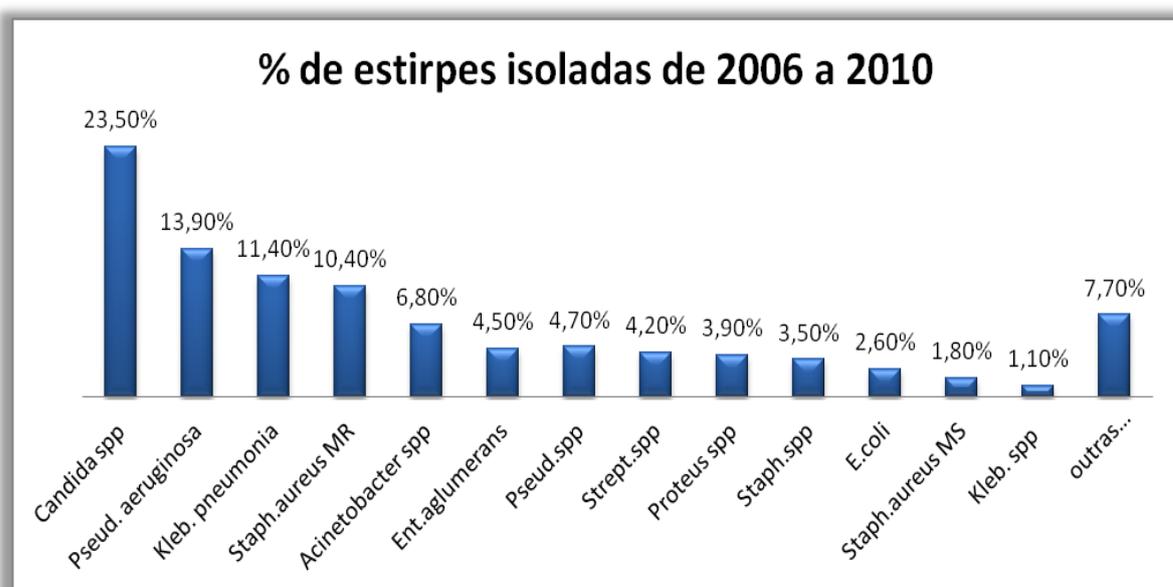
Figura 13: Percentagem das estirpes isoladas por ano

Observa-se que a estirpe de *Candida* spp desenvolveu-se em maior percentagem ao longo dos cinco anos, a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* tiveram um crescimento semelhante, destaca-se o ano de 2009 com um aumento substancial das percentagens de estirpes isoladas, respetivamente 23,3% e 16,6%.

A estirpe de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente teve um aumento acentuado em 2008 com 14,3% e em 2010 com 19,7% de todas as estirpes isoladas desse ano.

A espécie de *Acinetobacter* spp teve um desenvolvimento entre os 5% e os 10% em todos os anos.

A figura 14, esquematiza a percentagem média de todas as estirpes isoladas no período de 2006 a 2010.



**Figura 14: Percentagem média de estirpes isoladas de 2006 a 2010.**

Como pode ser observado a estirpe de *Candida* spp foi isolada em 23,5% dos exames bacteriológicos e culturais de expetoração efectuados, no entanto não se efetua o teste de sensibilidade antifúngico, por falta de capacidade técnica.

Com percentagens muito próximas, de 13,9%, 11,4% e 10,4% estão mais três estirpes, respetivamente: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus*

*aureus* meticilina-resistente. Com menor percentagem mas muito importante devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos está *Acinetobacter* spp com 6,8% de média de isolamentos.

Em estudos recentes as estirpes mais comuns nas PN são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* e *Acinetobacter* spp (Granito, et al., 2011).

No serviço de Medicina Interna do Hospital Central do Funchal, em 2009, os microrganismos mais frequentemente isolados em doentes com bacteriemias secundárias, foram por ordem crescente de frequência: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, MSSA, MRSA e *Escherichia coli*. (Granito, et al., 2011).

Nesse mesmo estudo, nas PN tardias, em que há uma elevada taxa de exposição antibiótica e/ou internamento prolongado, verificou-se que em 33% dos casos os microrganismos mais isolados foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp e MRSA (Granito, et al., 2011).

No presente estudo estas mesmas bactérias foram isoladas em 31,1% dos exames bacteriológicos e culturais de expetoração efetuados.

#### **10.4. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes mais isoladas**

##### **10.4.1. *Pseudomonas aeruginosa***

Foram testados vinte e sete antibióticos com ATB™ G - 5 (Refª. 14 315 bioMérieux®) e ATB® PSE 5 (Refª.14 345 bioMérieux®) em 147 estirpes isoladas.

A figura 15 apresenta em percentagem, o resumo das sensibilidades obtidas após a realização dos antibiogramas.

Verificou-se que a estirpe *Pseudomonas aeruginosa*, é 100% sensível á Colistina, sensível à Tobramicina com 39,1% do total das estirpes estudadas, à Amicacina com 35,6% de estirpes sensíveis, ambos Aminoglicosídicos, e ao Meropenem com 34,2%. No entanto só com 20,3% de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis ao Imipenem e à Gentamicina. Com sensibilidades muito semelhantes a Cefepima com 19,5%,

Piperacilina+Tazobactam com 19,5%, Piperacilina com 17,1% e Ciprofloxacina e Ceftazidima com 18,8%.

Com 100% de resistência a Amoxicilina, Amoxicilina+Ác. Clavulânico, Cefolatina, Cefoxitina, Ampicilina+Sulbactam e ao Cotrimoxazol.

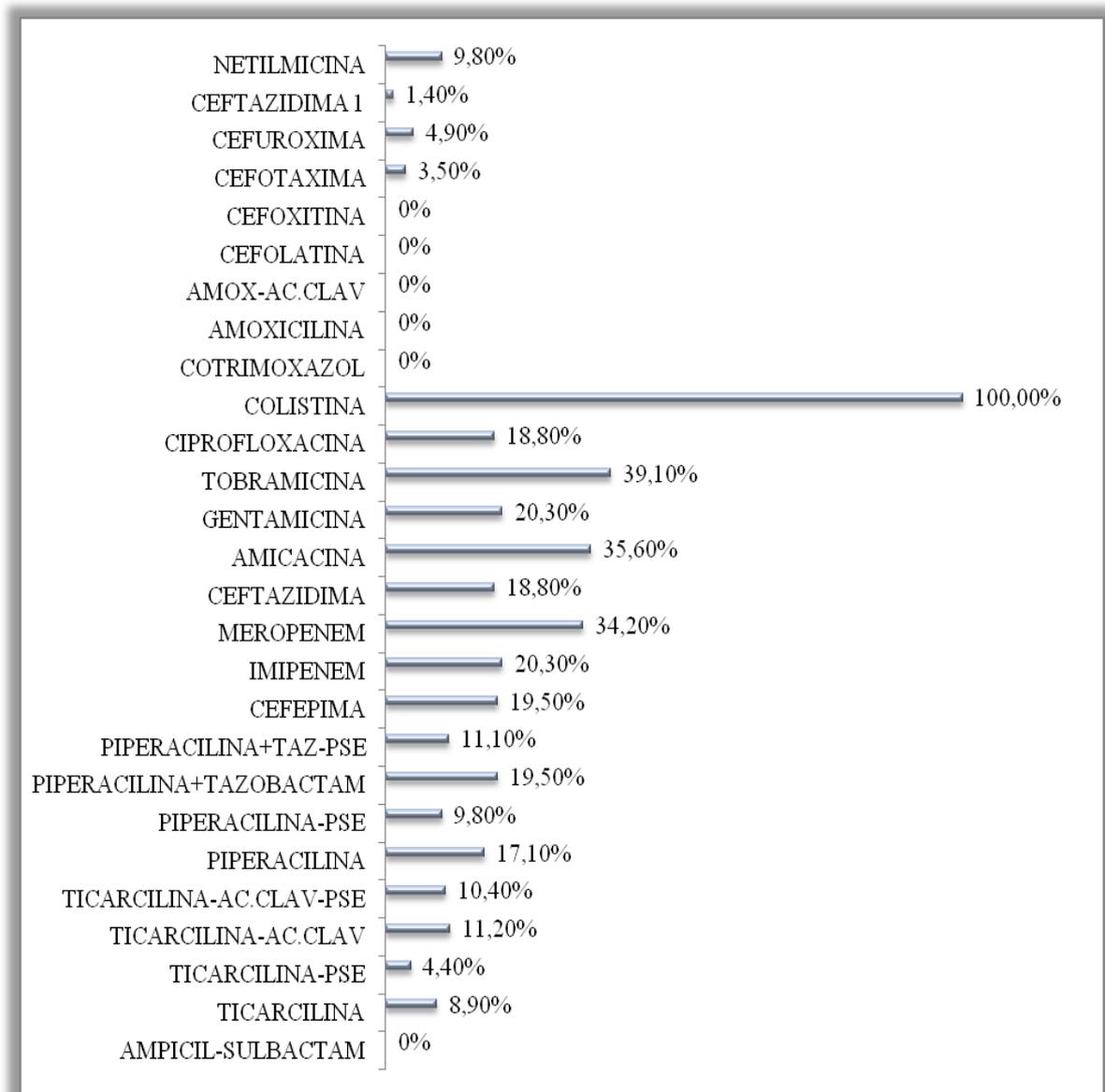
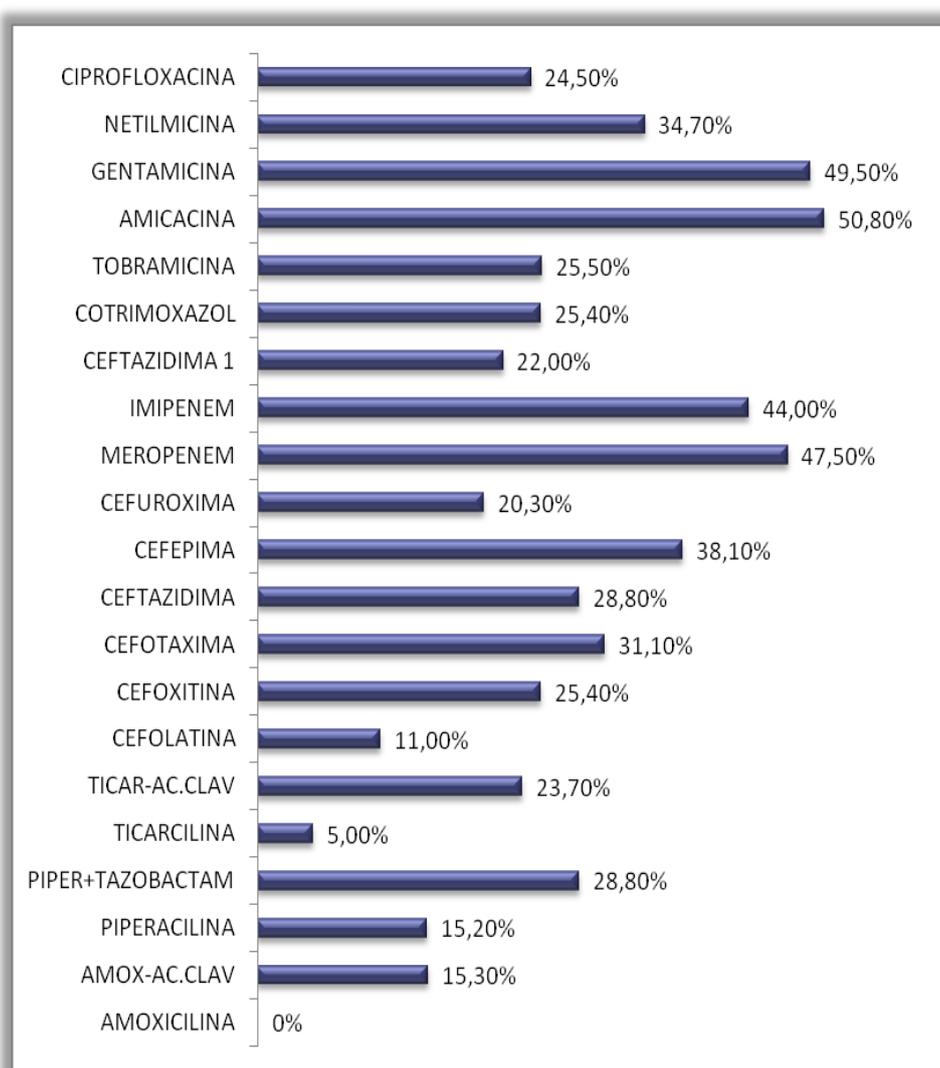


Figura 15: Percentagem de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis aos antibióticos estudados

#### 10.4.2. *Klebsiella pneumoniae*

Foram testados vinte e um antibióticos com ATB™ G - 5 (Refª. 14 315 bioMérieux®) em 120 estirpes isoladas.

A figura 16 apresenta o resumo das sensibilidades das estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, em percentagem, após a realização dos antibiogramas.



**Figura 16: Percentagem de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis aos antibióticos estudados**

Como pode ser observado nos resultados, as estirpes de *Klebsiella pneumoniae* estudadas, revelaram ter alta sensibilidade aos aminoglicosídeos, com 50,8% à Amicacina

e 49,5% á Gentamicina. Aos carbapenemos de 47,5% ao Meropenem e 44,0% ao Imipenem.

100% das estirpes são resistentes à Amoxicilina e à Ticarcilina só 5% das estirpes estudadas mostraram-se sensíveis.

No ano de 2009, registou-se a ocorrência de duas estirpes resistentes a todos os antibióticos estudados e duas estirpes só sensíveis à Amicacina.

Em 2010, foi registada uma estirpe só sensível à Amicacina e outras duas só sensíveis ao Imipenem e Meropenem.

#### **10.4.3. *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente**

Foram testados quinze antibióticos com ATB™ STAPH 5 (Refª. 14 325 bioMérieux®) em 109 estirpes isoladas.

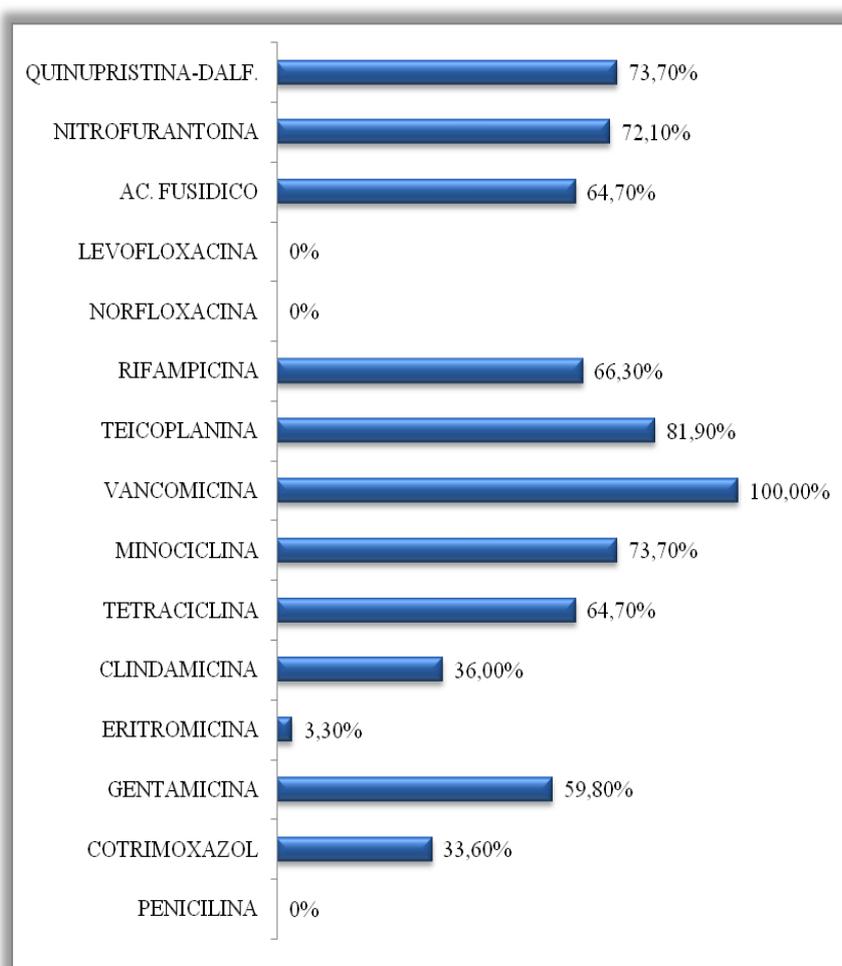
A figura 17 apresenta a percentagem da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente, obtidas após a realização dos antibiogramas.

Verificou-se que as estirpes de MRSA estudadas são 100% sensíveis á Vancomicina, apresentam também elevada sensibilidade a outro glicopeptídico, a Teicoplanina com 81,9%.

A sensibilidade destas estirpes às tetraciclinas pode ser observada com 73,7% á Minociclina e só 64,7% á Tetraciclina, uma vez que algumas estirpes de MRSA são resistentes às Tetraciclinas.

A sensibilidade de só 59,8% á Gentamicina também pode ser explicada pela resistência de estirpes de MRSA aos aminoglicosídicos.

Relativamente á Quinupristina-Dalfopristina com 73,7% de sensibilidade é explicada por esta associação de dois antibacterianos ter efeito bactericida nas estirpes de MRSA.



**Figura 17: Percentagem de estirpes de MRSA sensíveis aos antibióticos estudados**

Neste estudo observou-se que, as estirpes de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente, comprovaram ser 100% resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos. É 100% resistente às quinolonas (Levofloxacina e Norfloxacina).

A sensibilidade de 72,1% á Nitrofurantoína não tem interesse, uma vez que, este antibiótico só é utilizado para a profilaxia e o tratamento de infecções urinárias baixas (Sousa, 2006). A Rifampicina é utilizada como anti-tuberculoso.

No ATBTM STAPH 5 (Ref<sup>a</sup>. 14 325 bioMérieux®), existe um antibiótico, a oxacilina, que o seu estudo *in vitro* serve para predizer a resistência *in vivo* a todas as PPR e a todos os  $\beta$ -lactâmicos independentemente do resultado do antibiograma (Souza, et al., 2005).

Um aspeto muito interessante deste estudo, foi observar as altas prevalências de estirpes de MRSA versus MSSA ao longo dos cinco anos. No ano 2009 as estirpes de *Staphylococcus aureus* foram todas MRSA. A figura 18 demonstra a comparação, em valores percentuais, das estirpes isoladas de MRSA com as estirpes isoladas de MSSA.

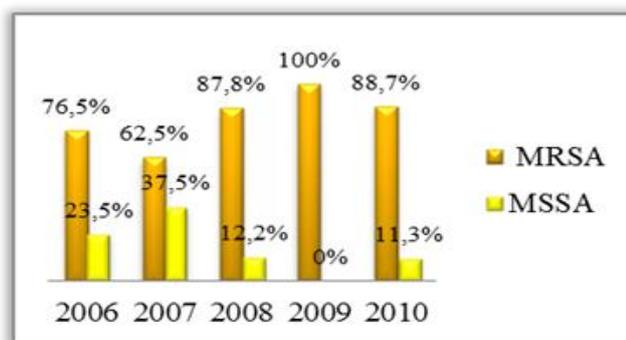


Figura 18: Percentagem de estirpes isoladas de MRSA versus MSSA.

#### 10.4.4. *Acinetobacter* spp

Foram testados vinte e um antibióticos com ATB™ G - 5 (Refª. 14 315 bioMérieux®) em 72 estirpes isoladas.

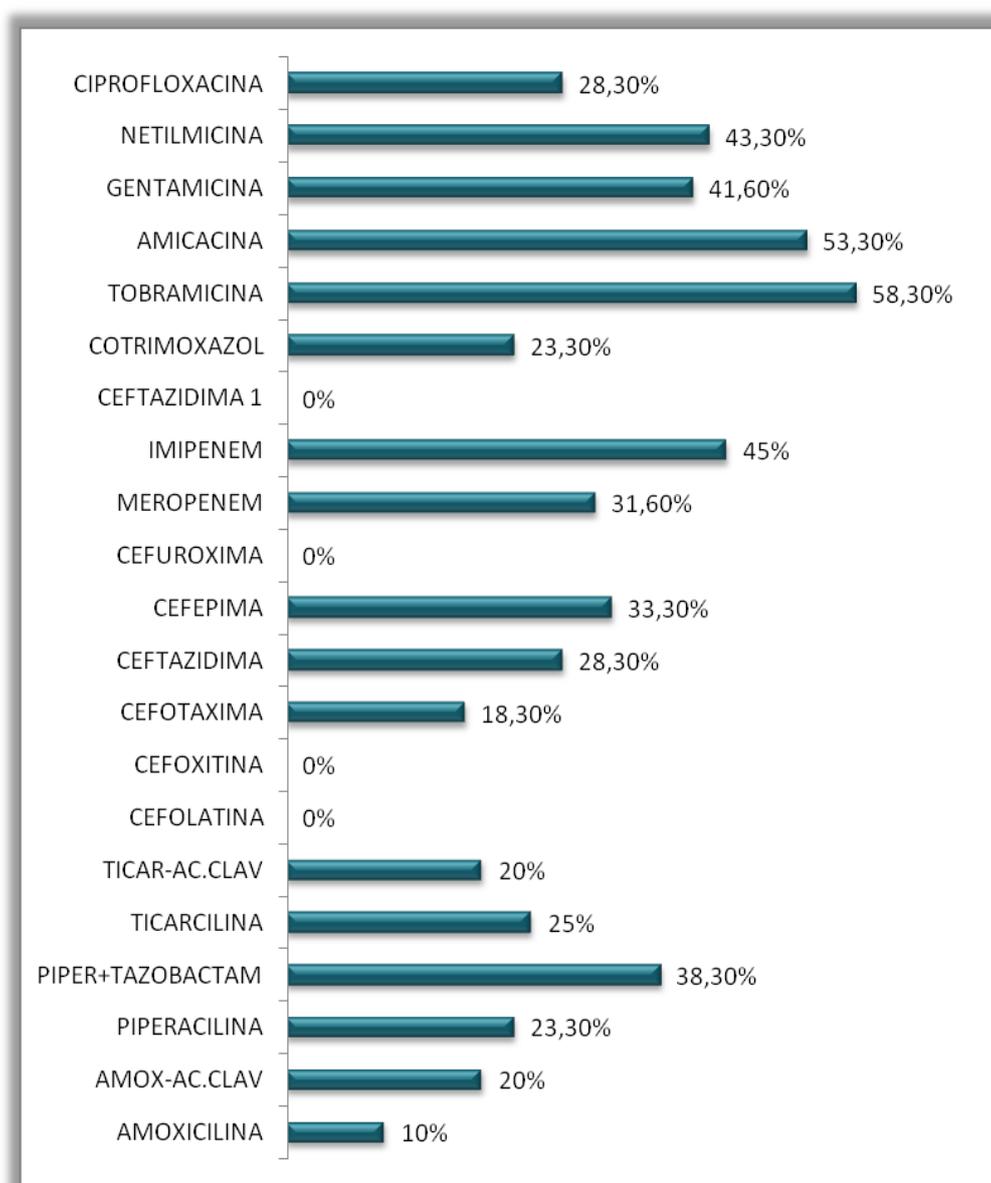
A figura 19 apresenta o resumo das sensibilidades, em percentagem, obtidas após a realização dos antibiogramas.

Neste estudo observou-se que, estirpes de *Acinetobacter* spp, mostraram-se mais sensíveis aos aminoglicosídeos, com 58,3% á Tobramicina, com 53,3% á Amicacina, com 43,3% á Netilmicina e 41,6% á Gentamicina.

Aos carbapenemos, 45% ao Imipenem e 31,6% ao Meropenem.

Foi observado 100% de resistência á Ceftazidima 1 (1mg/L). Este antibiótico faz a diferenciação das estirpes de Enterobacteriaceae potencialmente produtoras de ESBLs.

No entanto, com sensibilidade para Ceftazidima de 28,3% das estirpes estudadas, a concentração mínima inibitória do TSA é de 8 a 16 mg/L.



**Figura 19: Percentagem de estirpes de *Acinetobacter* spp sensíveis aos antibióticos estudados**

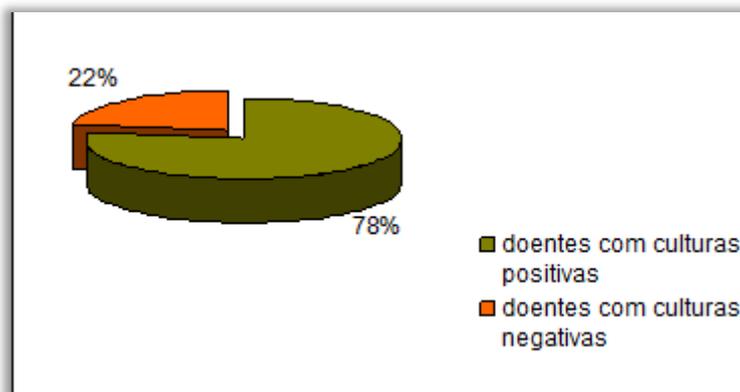
No ano de 2010, foram estudadas 10 estirpes de *Acinetobacter* spp mostraram-se resistentes a todos os antibióticos. A estas estirpes foi repetido o TSA com ATB® PSE 5 (Refª.14 345 bioMérieux®), foi observado que estas estirpes foram resistentes a todos os antibióticos exceto á Colistina.

## 11. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo serão comparados com um estudo semelhante realizado no mesmo hospital, nos anos de 2000 a 2005.

- No estudo anterior, dos 280 exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados, destes obtiveram-se 227 culturas positivas que corresponde a 81% exames pedidos (figura 20) (Madaíl, et al., 2006).

No presente estudo, de 2006 a 2010, foram estudados 1135 exames bacteriológicos e culturais de expetoração solicitados. Destes, tiveram crescimento bacteriano considerado patogénico 80,5%, que corresponde a um total de 904 exames. Apesar da diferença total de exames solicitados entre os dois estudos, obtiveram-se percentagens de amostras com crescimento bacteriano muito semelhantes.



**Figura 20: Percentagem de doentes com culturas positivas e negativas de 2000 a 2005 ( adaptado de Madaíl, et al., 2006)**

- No estudo anterior, dos 280 exames solicitados 80% referiam-se a doentes com idade superior a 65 anos (figura 21) (Madaíl, et al., 2006).

No presente estudo, 89% dos utentes do género masculino e 94% dos utentes do género feminino têm idade superior a 61 anos, passados 5 anos continua a ser a população mais idosa a estar internada.

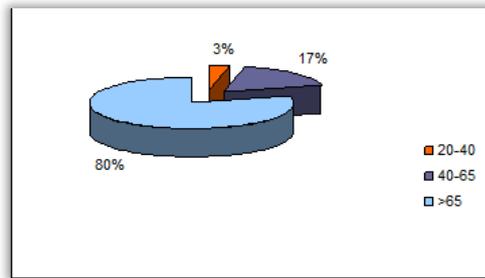


Figura 21: Faixa etária dos doentes do internamento de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006)

- No estudo anterior, quanto aos microrganismos isolados, o mais isolado foi *Candida spp* com 23,9%, seguida de *Pseudomonas spp* com 22,2%, *Staph.aureus* com 14% e *Klebsiella spp* 10,4% (figura 22) (Madaíl, et al., 2006).

No presente estudo, *Candida spp* foi isolada em 23,5%, *Pseudomonas spp* em 18,6%, *Staph. aureus* em 13,9% e *Klebsiella spp* em 12,5% (figura 23).

Apesar da diferença total de exames solicitados entre os dois estudos ser muito grande, obtiveram-se percentagens de isolamentos das mesmas estirpes muito semelhantes.

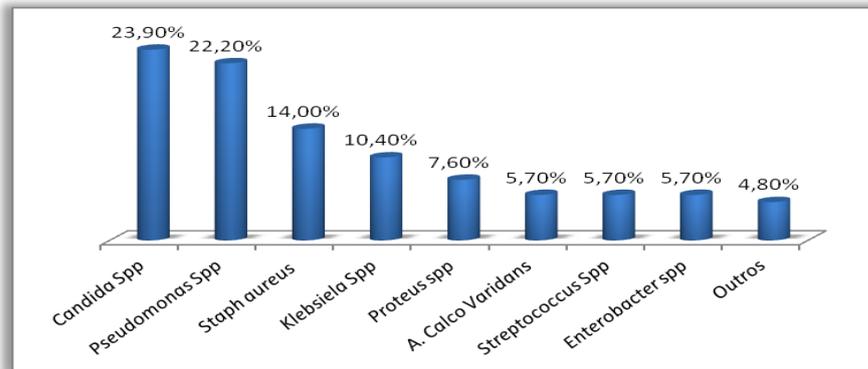


Figura 22: Percentagem de microrganismos isolados de 2000 a 2005 ( adaptado de Madaíl, et al., 2006)

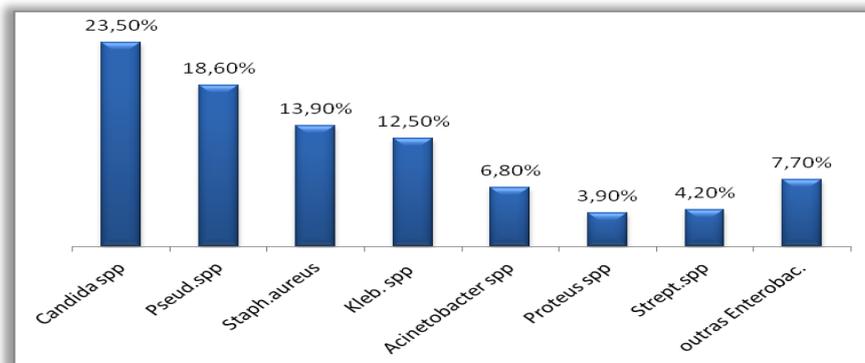


Figura 23: Percentagem de microrganismos isolados de 2006 a 2010.

- No estudo anterior, no perfil antimicrobiano de estirpes de *Pseudomonas* spp, verificou-se que esta é mais sensível ao Imipenem, Amicacina e à Tobramicina, evidenciando-se uma percentagem diminuta de sensibilidade à Amoxicilina + Ácido Clavulânico e ao Cotrimoxazol (figura 24) (Madaíl, et al., 2006).

No presente estudo verificou-se que a percentagem, de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, mais sensíveis à Tobramicina foi de 39,1%, à Amicacina foi de 35.6%, ao Meropenem de 34,2% e 20,3% de estirpes foram sensíveis ao Imipenem. No entanto verificou-se 100% de resistencia à Amoxicilina + Ácido Clavulanico e ao Cotrimoxazol.

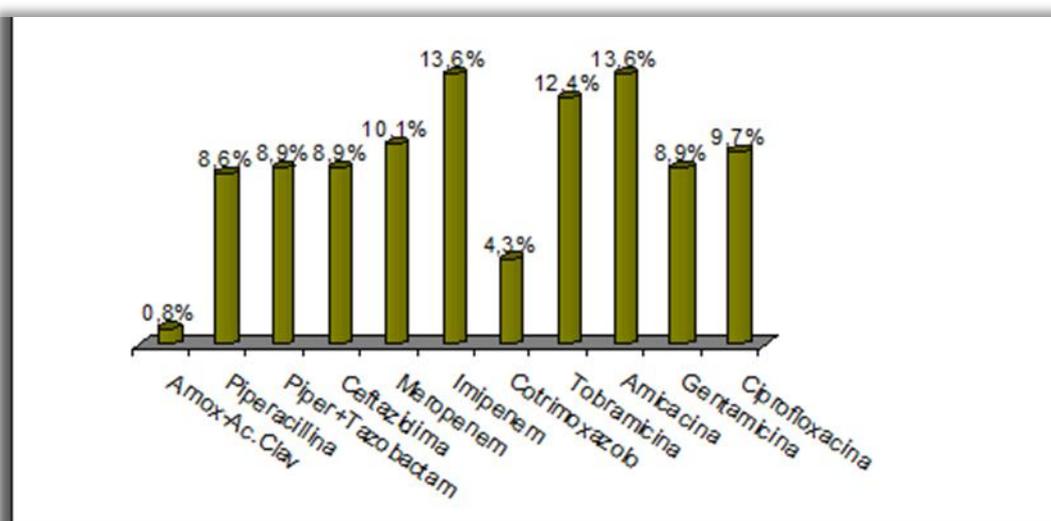
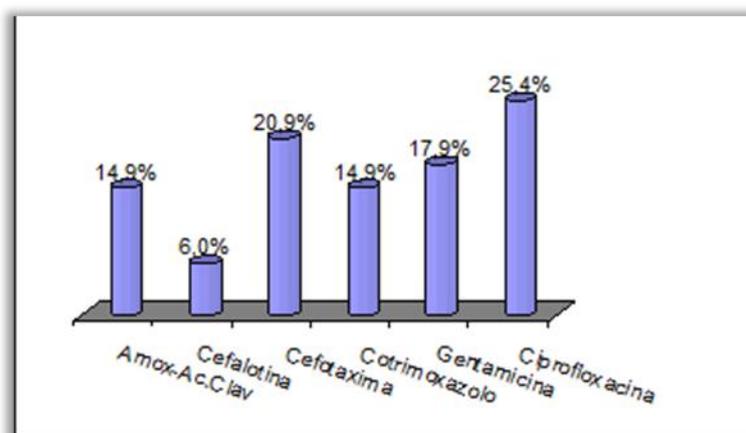


Figura 24: Percentagem de estirpes de *Pseudomonas* spp isolados de 2000 a 2005, sensíveis aos antibióticos ( adaptado de Madaíl, et al., 2006)

- O perfil antimicrobiano das estirpes de *Klebsiella* spp demonstrou uma percentagem maior de sensibilidade à Ciprofloxacina (25,4%), Cefotaxima (20,9%) e à Gentamicina (17,9%). Verificando-se por outro lado muito resistentes à Cefalotina (figura 25) (Madaíl, et al., 2006).

No presente estudo a percentagem de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis á Ciprofloxacina foi equivalente, mas á Cefotaxima foi de 31,1%, à Gentamicina e ao Cotrimoxazol, aumentou consideravelmente para 49,5% e 25,4% respectivamente. Á Cefalotina, aumentou ligeiramente, para 11%.

Verificou-se que após 5 anos as estirpes de *Klebsiella pneumoniae* não se tornaram mais resistentes.



**Figura 25:** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp de 2000 a 2005 (adaptado de Madaíl, et al., 2006)

- No estudo anterior de 2000 a 2005, não foram estudadas as espécies de MRSA, mas só de *Staph. aureus*. A espécie *Acinetobacter* spp não foi estudada.

## 12. CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS

Relativamente ao consumo de antibióticos no HVS os dados fornecidos pelo Serviço de Farmácia do hospital são relativos ao consumo anual, no Serviço de Medicina, dos anos 2007, 2008, 2009 e 2010. O consumo de 2006 não foi fornecido (Anexo 5).

Os dados são relativos ao consumo no Serviço de Medicina e não o consumo por doente, pelo que o objetivo de poder comparar o resultado dos testes de sensibilidades aos antibióticos, com o respetivo consumo, não foi alcançado.

No entanto pode-se retirar algumas considerações relativas ao consumo total de doses de antibióticos ao longo dos referidos anos.

O Protocolo de Medicina para as PN em vigor é de 2002, consiste na administração de Amoxicilina + Ác.clav.1,2g, Meropenem 1g ou Piperacilina+Tazobactam 4,5g com um Aminoglicosídeo. No caso de PN graves, a administração de Ceftriaxone 2g, em doentes com idade <60 anos, ou Ceftriaxone 1g, em doentes com idade >60 anos e Azitromicina 500mg.

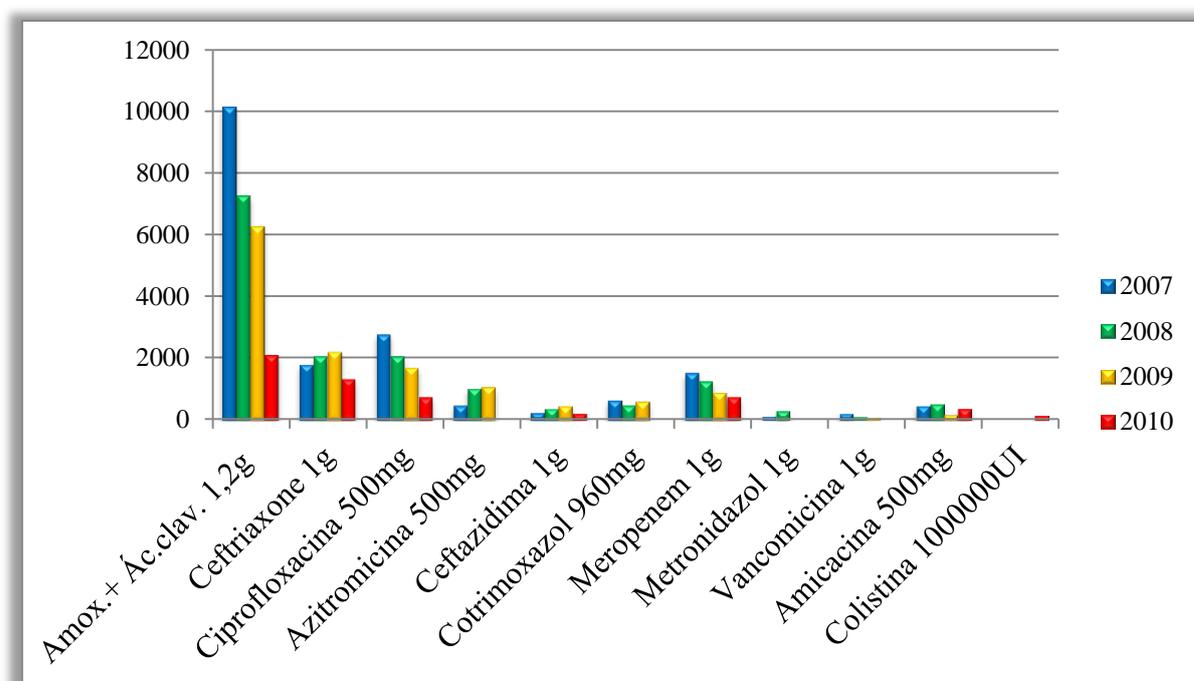
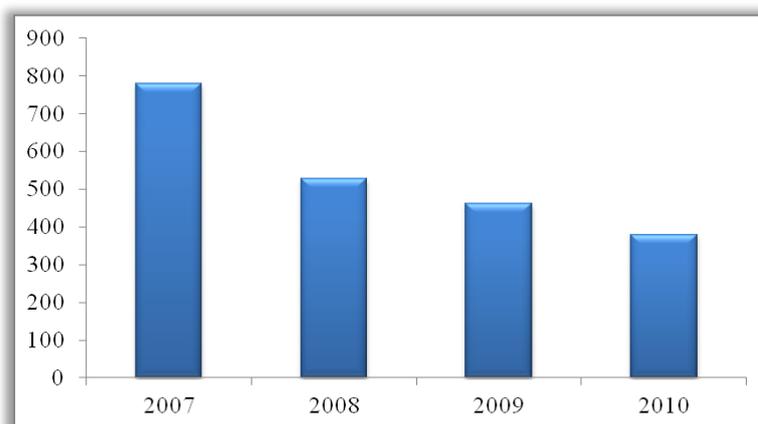


Figura 26: Resumo do consumo de antibióticos no serviço de medicina de 2007 a 2010 / doses unitárias.

A figura 26, refere-se à quantidade de doses administradas a todos os doentes do Serviço de Medicina Interna e não só aos doentes com pneumonias, no entanto a maioria dos doentes internados são idosos com pneumonias ou patologias respiratórias.

Outro dado fornecido pelo HVS, foi o numero de doentes internados no Serviço de Medicina Interna, em cada ano, desde 2007 a 2010 (figura 27).



**Figura 27: Numero total de doentes internados no Serviço de Medicina Interna de 2007 a 2010.**

Assim, após observação da figura 26 e 27, podemos inferir algumas considerações:

- O consumo de Amoxicilina+Ác.clavulanico, baixou muito, podemos deduzir que as estirpes que provocaram as infeções ganharam resistências, tendo a antibioterapia inicial, empírica, administrada ao doente ter sido substituída pela adequada, após a realização do exame bacteriológico e cultural de expetoração e o respectivo TSA.

- O consumo de Ciprofloxacina baixou significativamente de 2007 a 2010 e o consumo de Meropenem é pouco acentuado, o consumo de Ceftriaxone e Azitromicina, manteve-se ao longo dos anos, dado o protocolo em uso.

- O consumo de Colistina verificou-se apenas no ano de 2010, porque reflecte o isolamento de estirpes de *Acinetobacter* spp 100% resistentes a todos os antibióticos.

- Em geral, em 2010, o consumo de todos os antibióticos baixou, o que poderá refletir a redução do nº de doentes internados e o isolamento de estirpes provenientes

destes doentes se terem mostrado tão resistentes, que o Serviço de Medicina Interna teve de tomar medidas de isolamento dos doentes, tais como: diminuição do nº de doentes por enfermaria; adoção de medidas de desinfeção; restrição do nº de visitas, tendo-se ainda verificado o aumento de dias de internamento.

### 13. Conclusão

As infeções respiratórias são uma das principais causas de internamento hospitalar. A necessidade de tratar empírica e inicialmente as infeções respiratórias, faz com que seja necessário o conhecimento, em profundidade, das estirpes bacterianas mais comuns e o seu perfil de suscetibilidades, em cada zona geográfica.

Assim neste trabalho foram estudados os principais agentes etiológicos e o respectivo padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos, num hospital da região de Aveiro, no Serviço de Medicina Interna, num período de 5 anos, de 2006 a 2010.

Resumidamente concluiu-se que:

- Os microrganismos mais isolados foram *Cândida* spp (23,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,9%), *Klebsiella pneumoniae* (11,4%) *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (10,4%) e *Acinetobacter* spp (6,8%);
- Em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que as estirpes Gram-negativas em estudo apresentavam maior percentagem de sensibilidades aos Aminoglicosídeos, Carbapenemos, Cefalosporinas de 3ª geração e às Quinolonas de 2ª geração e elevadas resistências às Penicilinas e Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração;
- As estirpes de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, apresentaram alta percentagem de sensibilidade aos Glicopetídicos, Tetraciclina e aos Aminoglicosídeos, mas 100% resistentes às Penicilinas e às Quinolonas;
- Os resultados deste trabalho foram comparados com um estudo semelhante realizado no mesmo hospital de 2000 a 2005, passados 5 anos, a maior percentagem de exames bacteriológicos e culturais de expetoração, continua a ser de indivíduos idosos, a percentagem de estirpes isoladas é semelhante, mas o perfil de sensibilidade das mesmas alterou-se, com um aumento geral das resistências às Penicilinas, às Sulfonamidas e às Cefalosporinas.

- Relativamente ao consumo de antibióticos verificou-se que o Protocolo de Medicina Interna, em uso desde 2002, para o tratamento empírico e inicial das pneumonias, está desatualizado. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, aconselha-se a Comissão de Farmácia e Terapêutica do HVS alterar o protocolo de maneira a que o tratamento inicial seja o mais adequado, evitando gastos desnecessários e futuras resistências bacterianas.

#### 14. Bibliografia

- **Anglada, Rafael R.** Microbiologia Sanitaria y Clínica. s.l. : Sintesis, 1997.
- **ANVISA.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://www.anvisa.gov.br>. [revista em linha]. 2007. [Citado em: 14 de maio de 2012]; Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/mec\\_enzimatico.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm).
- **Arruda, É.** Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMU. Revista da sociedade Brasileira da Medicina Tropical. 31, , pp. 503-504. 1998.
- **Balows, Albert, et al.** Manual of Clinical Microbiology Fifth Edition. s.l. : ASM Publications: 222-234.1991
- **bioMerieux.** Manual de meios de cultura e suplementos 2003.
- **CDC.** Centers for Disease Control and Prevention [Revista em linha] 15 de outubro de 2009. [Citado em: 4 de setembro de 2012]; Disponível em: <http://www.cdc.gov/media/subtopic/library/DiseaseAgents/10046.tif>.
- **CDC.** Centers for Disease Control and Prevention [Revista em linha] 24 de novembro de 2010. [Citado em: 4 de setembro de 2012]; Disponível em: <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/acinetobacter.html>.
- **Dienstmann, Rosabel, et al.** Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. J Bras Patol Med lab. 20 de fevereiro de 2010, Vol. 46, pp. 23-27.
- **Drosos, Karageorgopoulos e Falagas, Matthew.** Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. The Lancet . dezembro de 2008, Vol. 8, pp. 751-762.

- **Elston, J., et al.** Centers for Disease Control and Prevention. [Revista em linha] julho de 2008. [Citado em: 18 de janeiro de 2012]; Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/1/07-0878.htm>.
- **Ferreira, Wanda F. e Sousa, João F. Sousa.** Microbiologia. s.l. : Lidel- Edições Técnicas, Vol. 2. 2000.
- **Ferreira, Wanda F. e Sousa, João F. Sousa.** Microbiologia. s.l. : Lidel - Edições Técnicas, pp. 19-51. Vol. 1. 1998.
- **Froes, Filipe, et al.** Revista Portuguesa de Medicina Intensiva. Revista Portuguesa de Medicina Intensiva, Vol. 1, pp. 7-30. 2007.
- **Gladwin, Mark e Trattler, Bill.** Microbiologia Fácil. s.l. : Revinter, 2002.
- **Granito, Sofia, et al.** Pneumonia nosocomial num Serviço de Medicina Interna. Med-Interna. 2, Vol. 18, pp. 71-78. 2011.
- **Hageman, Jeffrey C., et al.** Centers for Disease Control and Prevention [Revista em linha] setembro de 2006. [Citado em: 5 de setembro de 2012.]; Disponível em: [http://www.cdc.gov/hai/pdfs/visa\\_vrsa/visa\\_vrsa\\_guide.pdf](http://www.cdc.gov/hai/pdfs/visa_vrsa/visa_vrsa_guide.pdf).
- **INFARMED.** Prontuário terapeutico - 10. 10. s.l. : INFARMED, 2011.
- **Infoescola .** infoescola-Navegando e aprendendo. [Revista em linha] 13 de novembro de 2009. [Citado em: 23 de abril de 2012.]; Disponível em: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/11/estrutura-celular-bacterial1.jpg>.
- **Instituto Nacional de Estatística.** Portal do Instituto Nacional de Estatística. [Revista em linha] 2011. [Citado em: 10 de setembro de 2012.]; Disponível em: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_destaques&DESTAQUES\\_dest\\_boui=134582847&DESTAQUESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUES_dest_boui=134582847&DESTAQUESmodo=2)

- 
- **Madaíl, Fátima, Botte, Lucia e Tavares, Ana.** Perfil antimicrobiano das estirpes mais isoladas de expectorações em meio hospitalar e extra-hospitalar. Estarreja, 2006.
  - **Madigan, Michael T., Martinko, John M. e Parker, Jack.** Brock Biology of Microorganisms. 10ª Edição. s.l. : Upper Saddle River, 2003.
  - **Marques, Nuno, Araújo, Francisco e Soares, José D.** Infecções e antibioterapia num Serviço de Medicina. Med-Interna. 4, Vol. 12, pp. 203-208.2005.
  - **Microbiologia online.** Microbiologiaonlineblog; 2010 [atualizado em 2 de dezembro de 2010;Citado em 10 de março de 2012.]; Disponível em. <http://microbiologiaonlineblog.blogspot.pt/>.
  - **Murray, P. e Washington, J.** Microscopie and bacteriologie analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc., Vol. 50. 1975.
  - **Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S. e Pfaller, Michael A.** Microbiologia Médica. 6ª Edição. s.l. : Elsevier España, S.L., 2009.
  - **Oplustil, Camen P., Zoccoli, Cassia M, e Tobouti, Nina R.** Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ª Edição. São Paulo : Sarvier, 2010.
  - **Pereira, Claudia V.** Infecções urinárias causadas por Klebsiella spp. em ambulatório.[Web page] Aveiro : ria.ua,[atualizado em 2011; citado em 23 de julho de 2012]; Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/7390>
  - **Pina, Elaine, Silva, Goreti e Ferreira, Etelvina.** Direção-Geral da Saúde. [Revista em linha]; [acualizado em 2 de Setembro de 2011; Citado em 1 de Agosto de 2012]; Disponível em: <http://www.dgs.pt/>.
  - **Rosario, Nelson A. e Grumach, Anete S.** Scielo.br. Jornal de Pediatria. [Revista em linha]; [atualizado em novembro de 2006; Citado em 09 de agosto de 2012]; disponível em :

[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021755720060007000008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021755720060007000008&script=sci_arttext)

- **Sequeira, Clara M., M.** Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. Revista de la Ofil. 14, Vol. 1, pp. 45-68. 2004.
- **Silva, Rosemeri M.** Semiologia do Aparelho Respiratório: Importancia da avaliação do escarro. Arquivos Catarinenses de Medicina, Vol. 33, pp. 28-30. 2004.
- **Sousa, João C.** Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ª Edição. Porto : Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.
- **Souza, Marshal V., Reis, Cleômenes e Pimenta, Fabiana C.** Revisão sobre a aquisição gradual de resistencia de Staphylococcus aureus aos antimicrobianos. Revistas UFG. janeiro-abril de 2005, Vol. 34, pp. 27-36. 2005.
- **Swartz, M.** Hospital acquired infections:Diseases with increasingly limited therapies. Proceed of the Nacional Academics of Sciences of the USA. 29 de March de 1994, Vol. 97, pp. 2420-2427. 1994
- **Todd, James C., Henry, John B., Sanford, Arthur H., Davidson Israel.** Todd - Sanford - Davidson: Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8ª Edição. s.l. : Salvat, pp. 651-652. Vol. II.1988.
- **WHO. 2000.** World Health Organization. [Revista em linha] 2000. [Citado em 08 de abril de 2012]; Disponível em: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/index.html>.
- **Wikipedia.** wikipedia Ficheiro: Klebsiella pneumoniae [Revista em linha] 2012 [Atualizado em 6 de agosto de 2012; Citado em 30 de agosto de 2012]; Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Klebsiella\\_pneumoniae\\_01.png](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Klebsiella_pneumoniae_01.png).
- **Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS.** Pseudomonas Genome Database. [Revista em linha] 2011

[Atualizado em janeiro 2011; Citado em 30 de agosto de 2012.]; Disponível em:  
[http://www.pseudomonas.com/p\\_aerug.jsp](http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp).

- **Yigit, Hesna, et al.** Novel Carbapenem-Hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. abril de 2001, Vol. 45, pp. 1151-1161. 2001.

## **15. ANEXOS**

**ANEXO 1**

**PROCEDIMENTO OPERATIVO****COLORAÇÃO DE GRAM**

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem.

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia e de análises clínicas, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas das bactérias associadas a infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas em esfregaços de pus ou de fluidos orgânicos. Essa informação permite ao clínico monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. É possível a análise de vários esfregaços por lâmina, o que facilita a comparação de espécimes clínicos. As lâminas podem ser montadas de forma permanente e preservadas como documentação.

- Fazer o esfregaço, deixar secar e fixar pela chama
- Corar com violeta de cristal (1º corante) por 60 segundos;
- Lavar com água da torneira;
- Cobrir com Lugol (mordente) por 60 segundos;
- Lavar com água da torneira;
- Descorar com álcool a 95%, ou acetona (diferenciador), 10-20 segundos;
- Lavar com água da torneira, que vai para a diferenciação;
- Corar com safranina por 60 segundos (2º corante contrastante);
- Lavar com água da torneira, secar e observar ao microscópio.

Resultados: Gram (+) coram de roxo, Gram (-) coram de cor de rosa.



## PROCEDIMENTO OPERATIVO COLORAÇÃO DE GRAM

### RESPONSABILIDADES:

Acção	Responsável
Processamento das amostras	Técnica
Execução do teste	Técnica
Validação de resultados	Directora de Serviço

### REGISTOS:

Identificação	Indexação	Responsável pelo Arquivo	Arquivo Activo	Arquivo Passivo
Listas de Trabalho	Pasta da Secção	Técnica	6 meses	-----
Produtos em Falta	Pasta "Produtos em Falta"	Recepção	1 mês	-----

Elaborado	Aprovado

**ANEXO 2**

**PROCEDIMENTO OPERATIVO****Exame Bacteriológico de Expectorção****Exame Bacteriológico de Expectorção****COLHEITA**

Colher ao levantar, após enxaguar a boca com água, para um frasco esterilizado. Conservar à temperatura ambiente excepto se solicitado o estudo de micobactérias (BK) (deve refrigerar-se). Entregar o mais depressa possível no laboratório

**REGISTO**

Registrar no MOD.23: nº de identificação, data, nome e idade do doente, proveniência e registos anteriores

**GRAM  
E  
CULTURA**

Efectuar 3 esfregaços para coloração de Gram e 3 para coloração de Ziehl-Nielsen (se pedido); Corar duas de cada e guardar uma;

Semear por esgotamento por quadrantes com uma ansa esterilizada de 10µl nos meios de cultura:

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC2)(se necessário) Meio de Lowenstein-Jensen (LJ-T) (se pedido)	Gelose Columbia + 5% sangue de carneiro (COS) Incubar em O <sub>2</sub> a 37°C. 24h	Gelose Mac Conkey (MCK) Incubar em O <sub>2</sub> a 37°C, 24h	Gelose Chapman 2 (MSA 2) Incubar em O <sub>2</sub> a 37°C, 24h	Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) Incubar em CO <sub>2</sub> , a 37°C, 24h
---	---	--	--	--



## PROCEDIMENTO OPERATIVO

### Exame Bacteriológico de Expectoração

#### IDENTIFICAÇÃO

De acordo como desenvolvimento bacteriano e a observação de Gram, escolhe-se a galeria de **API** e **ATB** adequado e procede-se à execução de acordo com as bulas que acompanham as galerias. Colocam-se na estufa a 37°C

#### LEITURA DAS GALERIAS

A leitura é efectuada de acordo com as reacções químicas enzimáticas, sendo atribuído um código cuja leitura é feita no catálogo analítico respectivo (API).

A leitura das galerias ATB é visual e efectuada de acordo com o aspecto da cúpula ser claro (sensível) ou turvo (resistente), para os antibióticos com uma única concentração. Para os antibióticos com duas concentrações o resultado é dado por:

Aspecto das cúpulas		Resultados		A estirpe é	
c	C	c	C		
claro	claro	-	-	S	Sensível
turvo	claro	+	-	I	Intermédio
turvo	turvo	+	+	R	Resistente

A ausência de crescimento em pelo menos uma das cúpulas do controlo (designado por 0 no início da galeria ATB) invalida o antibiograma que deve ser novamente efectuado. Um resultado c(-) C (+) é um contra-senso devendo-se repetir o teste com nova galeria.

Na leitura um crescimento limitado à periferia da cúpula deve ser lido como negativo.

Deve-se considerar como negativo qualquer crescimento inferior ao do controlo para o Trimetoprim-sulfametoxazol (TSU).



## PROCEDIMENTO OPERATIVO

### Exame Bacteriológico de Expectorção

#### Limites do teste:

- Um tempo de espera entre as diversas etapas da manipulação pode afectar os resultados.
- Devem apenas ser utilizadas culturas puras contendo um único tipo de microrganismo. As culturas mistas ou contaminadas podem afectar o resultado.

#### **RESPONSABILIDADES:**

Acção	Responsável
Registo da identificação da amostra	Técnica
Processamento de amostras	Técnica
Escolha das galerias API e ATB adequadas	Técnica / Directora de Serviço
Leituras das galerias	Técnica / Directora de Serviço
Validação de resultados	Directora de Serviço

#### **REGISTOS:**

Identificação	Indexação	Responsável pelo Arquivo	Arquivo Activo	Arquivo Passivo
Listas de Trabalho	Pasta da Secção	Técnica	2 meses	6 meses
Produtos em Falta	Pasta "Produtos em Falta"	Recepção	1 mês	-----

**ANEXO 3**

**PROCEDIMENTO OPERATIVO****CATALASE****PRINCIPIO:**

A presença de Catalase é detectada nos microrganismos por uma libertação de O<sub>2</sub> a partir de água oxigenada. A presença de um agente espessante e de um corante facilitam a observação da emissão gasosa.

**REAGENTES:**

ID Color Catalase (ID-Ase) Ref. 55561 – BioMérieux

**Condições de armazenamento de reagentes:**

Reagentes a temperatura de 2°-8°C, armazenar em posição vertical, até ao fim da data de validade indicada na embalagem. Após a abertura são estáveis 3 meses a 2°-8°C.

**MATERIAL NECESSÁRIO:**

- Lâminas de vidro;
- Ansas de plástico ou bastonetes descartáveis.

**AMOSTRAS UTILIZADAS:**

Colónias a testar isoladas em meio gelosado, com morfologia de cocos e gram positivos.

**PROCEDIMENTO:**

Deixar o reagente atingir a temperatura ambiente.

**Teste em lâmina:**

- 1°- Colocar na lâmina 1 gota de ID Color Catalase;
- 2°- Dispensar 1 a 2 colónias na gota do reagente;
- 3°- Leitura

**Leitura e interpretação de resultados:**

A presença de uma catalase traduz-se pela emissão imediata de bolhas de oxigénio.

**Limites do teste:**

Não é recomendado fazer este teste a partir de colónias isoladas na gelose Gardnerella.

**ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS:**

- O tratamento e a eliminação de resíduos devem ser feitos em conformidade com a regulamentação aplicável.

Todo o material utilizado para a realização do teste (lâminas de vidro, ansas de plástico e/ou bastonetes descartáveis) devem ser colocados nos contentores para resíduos de risco UN3291 resíduos clínicos não específicos – Contentores Amarelos.

**PROCEDIMENTO OPERATIVO****CATALASE****RESPONSABILIDADES:**

<b>Acção</b>	<b>Responsável</b>
Processamento das amostras	Técnica
Execução do teste	Técnica
Validação de resultados	Directora de Serviço

**REGISTOS:**

<b>Identificação</b>	<b>Indexação</b>	<b>Responsável pelo Arquivo</b>	<b>Arquivo Activo</b>	<b>Arquivo Passivo</b>
Listas de Trabalho	Pasta da Secção	Técnica	6 meses	-----
Produtos em Falta	Pasta "Produtos em Falta"	Recepção	1 mês	-----

<b>Elaborado</b>	<b>Aprovado</b>

**ANEXO 4**

Chefe de Serviço de Patologia Clínica  
Hospital do Visconde de Salreu  
Dr.ª Fátima Madalí

Algo de  
14.2.2012

Sara de Ascensão Quadros Lopes, técnica de 1ª classe de Análises Clínicas e Saúde Pública do serviço de Patologia Clínica do Hospital do Visconde de Salreu, vem pedir autorização para a utilização de dados registados no Mod. 23, "Registo Bacteriologia Expectorção", nos anos 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010. Os dados serão utilizados para a elaboração da Tese de Dissertação do Mestrado de Microbiologia da Universidade de Aveiro, com o tema: Suscetibilidade de antimicrobianos em isolados de expetorações.

Pede deferimento:  
Sara de Ascensão Quadros Lopes

Sara de Ascensão Quadros Lopes  
13 de fevereiro de 2012

AO PCA  
para se processar  
relativamente ao pedido. Sem  
reser de sig. 14/2/2012

**ANEXO 5**

Presidente do Conselho de Administração  
Hospital do Visconde de Salreu

As A. Rodrigues Cláudio para  
emissão de parecer

17.2.2012  
A. Rodrigues

23.2.2012

Sara de Ascensão Quadros Lopes, técnica de 1ª classe de Análises Clínicas e Saúde Pública do Serviço de Patologia Clínica do Hospital do Visconde de Salreu, vem pedir autorização para a utilização de dados referentes ao consumo de antibióticos no Serviço de Medicina Interna nos anos 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010. Os dados serão utilizados para a elaboração da Tese de Dissertação do Mestrado de Microbiologia da Universidade de Aveiro, com o tema: "Suscetibilidade de antimicrobianos em isolados de expetorações".

Pede deferimento:  
Sara de Ascensão Quadros Lopes

Sara de Ascensão Quadros Lopes  
16 de fevereiro de 2012

As A. Rodrigues:  
Os dados referentes ao  
consumo de antibióticos deve  
ser solicitado à farmacêutica,  
Dr. Ana Rodna, do HVS.  
A. Rodrigues 22/2/2012