



Cátia Sofia Simões Família

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

Avaliação de bacteriófagos com atividade antibacteriana em isolados provenientes de doentes com pneumonia associada ao ventilador

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Patrícia Cavaco Silva,
PhD
Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves,

Arguente: Doutora Maria Helena de Sousa Barroso,

Orientadora: Doutora Patrícia Maria Cavaco Silva Sá Montez



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2013

Copyright Cátia Sofia Simões Família, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer á minha orientadora Professora Doutora Patrícia Cavaco Silva pelo facto de me ter confiado este projeto, pelo seu acompanhamento, apoio prestado e por me ter orientado ao longo do trabalho. Ao Professor Doutor Miguel Garcia por me ter aceite na sua empresa. À Sofia Corte Real por ter ajudado na elaboração deste projeto. À Professora Doutora Madalena Pimentel por todas as suas opiniões e dicas dadas. Ao Doutor João João Mendes por todo o auxílio prestado nos conceitos médicos. A todos os meus colegas da Techhophage pelo bom ambiente de trabalho e boa disposição. Um agradecimento especial à Clara que durante 13 meses foi incansável pela sua disponibilidade e paciência e às minhas colegas de unidade a Joana, a Daniela e a Raquel.

Ao Professor Doutor Melo Cristino e ao Professor Doutor Mário Ramirez por terem permitido o acesso a recursos tecnológicos essenciais à realização do estudo.

À Doutora Cristina Toscano pelo apoio exaustivo prestado através da disponibilização de todos os dados fulcrais à execução deste estudo e pela sua disponibilidade. À Professora Doutora Teresa Marques por ter aceite e colaborado com este estudo em parceria com o CHLO. À Doutora. Helena Farinha, Diretora Técnica da Farmácia do Hospital Egas Moniz que disponibilizou a utilização dos dados sobre a terapia antibiótica e ao Doutor João Rijo que os facultou.

Às minhas colegas de mestrado e às nossas longas tardes e noites de estudo acompanhadas de crepes com nutella, sem esses dias teria sido mais difícil concluir o 1º ano.

A todos os meus amigos que me acompanham desde sempre fazendo questão de me tirar de casa antes que os meus neurónios explodissem. Um especial obrigado ao meu Manunxo que durante estes anos sempre me apoiou. Às minhas melhores amigas de infância, à Raquel por ter feito de tudo para me distrair e animar e à Inês pelas noitadas a ver filmes da Disney para recordar sempre aquele lado infantil inato a todos nós. Ao meu grande amigo Diogo, que a conclusão da minha tese te dê força para continuares a estudar.

Ao andebol que sempre foi a minha escapatória, às minhas colegas de equipa por me acompanharem ao longo de tantos anos, às minhas meninas que me roubavam um sorriso ao final do dia e a toda a direção do G.D.R Quinta Nova que me acolheu quando eu era ainda muito nova e da qual hoje eu faço parte.

A toda a minha família que sempre me apoiou nas decisões que tomei ao longo destes anos escolares, por todos os jantares, por todos os passeios, por todos os conselhos sábios e por todos os momentos passados em convívio. Um especial agradecimento à minha madrinha que sempre me acompanhou e guiou ao longo deste percurso e ao meu tio Carlos por ter acreditado no meu potencial e por me ter guiado na escolha do curso.

Por fim, aos meus queridos pais que sempre apostaram no meu conhecimento concedendo-me uma bolsa de estudo que durou uns longos 5 anos, por terem feito de mim a pessoa que sou hoje, por me

terem aturado incondicionalmente entre frustrações e alegrias e sem os quais este mestrado não teria sido possível.

Ao meu querido Bruno que sempre foi um rapaz extremamente atencioso, paciente e pacato ao longo desta tese. Que me ajudou a ultrapassar todas as adversidades que surgiam no dia-a-dia abraçando-me dizendo que estava apenas perante um dia mau e que o amanhã seria decerto melhor. Por teres sido um companheiro extremamente presente que sempre me apoiaste e ajudaste em tudo o que podias. Obrigada.

Resumo

A pneumonia associada ao ventilador (PAV) é a pneumonia nosocomial mais prevalente, desenvolvendo-se num doente, 48 horas ou mais, após a sua intubação endotraqueal e ventilação mecanicamente assistida. É uma infeção grave com impacto elevado na saúde pública, pois contribui para um aumento da mortalidade e morbilidade hospitalar. Os seus agentes etiológicos variam conforme a área geográfica e a população em questão, contudo as bactérias multirresistentes *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) são das mais prevalentes. A terapia antimicrobiana da PAV, quando inadequada, está associada a um aumento da mortalidade e quando administrada excessivamente leva a complicações, custos elevados e contribui para a emergência de agentes patogénicos resistentes.

Neste contexto têm surgido diversos estudos com o intuito de utilizar bacteriófagos como agentes antimicrobianos. Os bacteriófagos são de fácil isolamento, ubíquos na natureza, específicos, não tóxicos para o Homem e comprovaram ser eficazes em diversos estudos contra infeções bacterianas em humanos.

O presente estudo teve a duração de 13 meses (Julho/2012 a Julho/2013) e consistiu na caracterização de três espécies patogénicas isoladas de doentes diagnosticados com PAV: *S. aureus*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Teve como objetivo avaliar a eficácia de vários bacteriófagos contra as diferentes estirpes das espécies em estudo.

Verificou-se no estudo um grave problema de resistências aos antibióticos encontrando-se várias estirpes multirresistentes e pan resistentes. Para caracterizar estas espécies realizou-se um método de tipagem molecular (PFGE-eletroforese em campo pulsado) que demonstrou uma grande variabilidade genotípica na espécie *P. aeruginosa* e uma grande clonalidade entre as estirpes de *A. baumannii*.

Quando testada a atividade do painel de bacteriófagos, verificou-se que foram muito eficazes contra *Staphylococcus aureus*, tendo-se obtido uma percentagem de infeção muito significativa (94,12% e 70,6% para 2 bacteriófagos).

Em conclusão, estes resultados apresentam novas perspetivas sobre a utilidade da terapia fágica em infeções graves nosocomiais.

Palavras-chave: pneumonia associada ao ventilador; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; *Staphylococcus aureus*; PFGE; bacteriófagos

Abstract

The ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most prevalent nosocomial pneumonia developing in patients 48 hours or more after endotracheal intubation and mechanically assisted ventilation. It is a serious infection, with a high impact in public healthcare due to the fact that it contributes to an increase in hospital mortality and morbidity. Its etiological agents vary by geographical area and population, however, one of the most prevalent multi-resistant bacteria are *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* (MRSA). Inadequate antibiotic therapy increases mortality, and excessive antibiotic therapy increases health issues, costs and contributes to the emergence of resistant pathogens.

In this context, there have emerged many studies using bacteriophages as antimicrobial agents. Bacteriophages are easily isolated, ubiquitous in nature, specific, non-toxic to humans and have proved their efficacy in many studies against human bacterial infections.

This study lasted for a thirteen-month period (July/2012 to July/2013) and the purpose was to characterize three different pathogens isolated from patients with VAP: *S. aureus*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. The objective was to evaluate bacteriophage efficacy against the three species studied.

In this study, we found a serious resistance problem in the analyzed pathogens, including many multi-resistant and pan resistant strains. To characterize these species, a method of molecular typing (PFGE-pulse field gel electrophoresis) was performed, which proved a substantial genetic variability in *P. aeruginosa* specie and a large clonality between *A. baumannii* strains.

When tested the activity of the panel of bacteriophages, it was found that the phages were very effective against *S. aureus*, having obtained a very significant percentage of infection (94,12% and 70,6% for two bacteriophages).

In conclusion, these results offer new perspectives on the usefulness of bacteriophage therapy to treat severe nosocomial infections.

Keywords: ventilator associated pneumonia; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; *Staphylococcus aureus*; PFGE; bacteriophages;

Índice

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos.....	xiii
I. Introdução	1
1. PAV	1
1.1 Diagnóstico	2
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Etiologia	3
1.4 Tratamento.....	4
1.5 Prevenção.....	5
2. Género <i>Pseudomonas</i>	6
3. Género <i>Acinetobacter</i>	7
4. Género <i>Staphylococcus</i>	8
5. Resistências aos antimicrobianos	8
5.1 β -Lactâmicos.....	8
5.2 Glicopéptidos	10
5.3 Aminoglicosídeos.....	11
5.4 Macrólidos.....	11
5.5 Quinolonas.....	11
6. Tipagem Molecular.....	12
6.1 Eletroforese em campo pulsado.....	12
6.2 Outras técnicas	13
7. Bacteriófagos	14
7.1 Introdução	14
7.2 Aplicações.....	16
7.3 Terapia fágica	16
II. Materiais e Métodos	20
1. População e amostra	20
1.1 População.....	20

1.2	Duração	20
1.3	Critérios de elegibilidade	20
1.4	Critérios de exclusão.....	20
1.5	Ética e confidencialidade.....	20
2.	Recolha de informação	20
3.	Isolamento, identificação e AST das bactérias	21
4.	Métodos de Biotipagem.....	22
4.1	Testes Fenotípicos.....	22
4.1.1	Teste de sinergia de disco duplo (DDST).....	22
4.1.2	Teste Modificado de Hodge	23
4.1.3	Teste de sinergia com EDTA	24
4.1.4	Teste tridimensional.....	24
4.1.5	Teste de disco AmpC.....	25
4.1.6	Teste de resistência à oxacilina	25
4.2	Tipagem Molecular por PFGE	26
4.2.1	<i>P. aeruginosa</i>	26
4.2.2	<i>A. baumannii</i>	27
4.2.3	<i>S. aureus</i>	28
5.	Testes para determinar a atividade lítica dos bacteriófagos	30
5.1	Teste de infecção por <i>spot</i>	30
5.2	Teste de quantificação dos bacteriófagos	30
6.	Interpretação de resultados	31
6.1	Dendogramas.....	31
6.2	Análise estatística	31
III.	Resultados.....	32
1.	Análise microbiológica.....	32
1.1	Caracterização sociodemográfica	32
1.2	Prevalência	33
1.3	Agentes etiológicos da PAV	34

1.4	Testes de suscetibilidade aos antibióticos.....	34
1.5	Tempo de internamento	35
1.6	Antibioterapia	36
2.	Testes fenotípicos	37
2.1	ESBL.....	37
2.2	Teste Modificado de Hodge (MHT).....	37
2.3	Teste de sinergia com EDTA.....	38
2.4	Teste de disco AmpC.....	38
2.5	Teste tridimensional (3D)	39
2.6	Teste da resistência à oxacilina	39
3.	Tipagem Molecular.....	40
3.1	Eletroforese em campo pulsado para <i>P. aeruginosa</i>	40
3.2	Eletroforese em campo pulsado para <i>A. baumannii</i>	42
3.3	Eletroforese em campo pulsado para <i>S. aureus</i>	43
4.	Teste para determinar a atividade lítica dos bacteriófagos	45
4.1	Teste de infecção por spot.....	45
4.2	Teste de quantificação dos bacteriófagos	46
IV.	Discussão.....	49
V.	Bibliografia	55

Índice de figuras

I. Introdução

- Figura I. 1** - Alvos dos antibióticos e mecanismos de resistência. Adaptado de Wright, 2010..... 10
- Figura I. 2** - Representação esquemática do CHEF. Retirado de Bio-Rad 2013..... 13
- Figura I. 3** - Ciclo celular de um fago temperado. Adaptado de Campbell, 2003 15

II. Materiais e métodos

- Figura II. 1** - Representação esquemática do DDST. CRO- ceftriaxona 30 µg; CTX- cefotaxime 30 µg; CAZ- ceftazidima 30 µg; FEP- cefepime 50µg; AMC- amoxicilina/ácido clavulânico 30 µg. 23
- Figura II. 2** - Representação esquemática do teste modificado de Hodge. As setas representam os inóculos da estirpe a testar do centro da placa à periferia. IPM- imipenemo 10µg 23
- Figura II. 3** - Representação esquemática do teste de sinergia com o EDTA. IPM- imipenem 10µg; B- disco com EDTA..... 24
- Figura II. 4** - Representação esquemática do teste tridimensional. Os cortes lineares, com as estirpes teste, fazem-se a 5milímetros do disco de cefoxitina (FOX)..... 25
- Figura II. 5** - Teste de disco AmpC. Disco de cefoxitina (FOX) e disco branco (B). 25

III. Resultados

- Figura III. 1** - Distribuição sazonal dos isolados recolhidos 33
- Figura III. 2** - Distribuição de todos os isolados bacterianos (n=103) causadores de PAV nas UCI do CHLO..... 34
- Figura III. 3** - Distribuição dos isolados bacterianos em estudo causadores de PAV nas UCI do CHLO 34
- Figura III. 4** - Resistência das estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* aos antibióticos..... 35
- Figura III. 5** - Resistência das estirpes de *S. aureus* aos antibióticos..... 35
- Figura III. 6** - Teste modificado de Hodge suplementado com sulfato de zinco (aspeto de trevo). 1- Da esquerda para a direita: controlo positivo; 2 estirpes (*A. baumannii*) produtoras de MBL. 2- Da esquerda para a direita: controlo negativo (ATCC 27853); 2 estirpes (*P. aeruginosa*) não produtoras de MBL. 38

Figura III. 7 - Teste de sinergia ao EDTA. 1- Estirpe positiva de <i>P. aeruginosa</i> que mostra uma zona sinérgica de inibição entre o disco de imipenem e o disco de EDTA. 2- Controlo negativo (ATCC 27853) que não apresenta zona sinérgica. IPM- imipenem.....	38
Figura III. 8 - Teste de disco AmpC. 1- Estirpe de <i>A. baumannii</i> com resultado positivo pois apresenta zona dentada à volta do halo de cefoxitina (FOX); 2- Estirpe de <i>A. baumannii</i> com resultado negativo.	39
Figura III. 9 - Teste tridimensional. 1- Da esquerda para a direita: controlo positivo; 3 estirpes (<i>A. baumannii</i>) possíveis produtoras de enzimas AmpC. 2- Da esquerda para a direita: controlo negativo (ATCC 27853); 2 estirpes (<i>P. aeruginosa</i>) não produtoras de AmpC. FOX- cefoxitina	39
Figura III. 10 - Teste de resistência à oxacilina. Estirpes MRSA mostram crescimento em placa e estirpes MSSA não exibem crescimento em placa.	40
Figura III. 11 - Perfis obtidos por PFGE de <i>P. aeruginosa</i> . Linhas M lambda ladder PFGE marker. Linhas 1 a 9 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases).....	41
Figura III. 12 - Dendograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 9 estirpes de <i>P. aeruginosa</i> . À direita encontram-se os dados relativos à data de colheita, hospital e perfil de resistência. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier; HSC- Hospital Santa Cruz; MR- multirresistente.	41
Figura III. 13 - Perfis obtidos por PFGE de <i>A. baumannii</i> . Linhas M lambda ladder PFGE marker. Linhas 1 a 11 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)...	42
Figura III. 14 - Dendograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 10 estirpes de <i>A. baumannii</i> . Estirpes com proximidade genética superior a 90% foram consideradas do mesmo clone. Ao lado estão os dados relativos à data de colheita e hospital. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier;	43
Figura III. 15 - Perfis obtidos por PFGE de <i>S. aureus</i> . Linhas M lambda ladder PFGE marker. Linhas 1 a 17 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)	44
Figura III. 16 - Dendograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 17 estirpes de <i>S. aureus</i> . Estirpes com proximidade genética superior a 90% foram consideradas do mesmo clone. Ao lado estão os dados relativos à data de colheita, hospital e perfil de resistência. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier; MR- multirresistente.	45
Figura III. 17 - Resultado do teste de infeção por spot. Placas líticas dos bacteriófagos de <i>S. aureus</i>	46
Figura III. 18 - Resultado de uma infeção por placa. Diluições seriadas do bacteriófago F125/10 de <i>S. aureus</i>	47
Figura III. 19 - Mapa com as estirpes infetadas pelos bacteriófagos F44/10 e F125/10 e respetivos títulos. Vermelho- sem infeção; Verde-claro- infeção com título inferior ao da estirpe de propagação; Verde-escuro- Título igual ou superior ao da estirpe de propagação	47

Figura III. 20 - Mapa com as estirpes infetadas pelos bacteriófagos F44/10 e F125/10 e respetivos títulos. Vermelho- sem infeção; Verde-claro- infeção com título inferior ao da estirpe de propagação; Verde-escuro- Título igual ou superior ao da estirpe de propagação. 48

Índice de tabelas

I. Introdução

Tabela I. 1 - Agentes etiológicos causadores de PAV..... 2

II. Materiais e métodos

Tabela II. 1- Critérios de validação dos diferentes tipos de amostra do trato respiratório inferior 21

III. Resultados

Tabela III. 1 - Caracterização da amostra dos doentes com PAV 32

Tabela III. 2 - Tempo (dias) de internamento nas diferentes unidades do Hospital 36

Tabela III. 3 - Nº de estirpes com antibioterapia prévia (AP) e sem antibioterapia prévia (AP) e as suas respetivas resistências (n) 37

Tabela III. 4 - Títulos (pfu plaque forming units) dos diferentes bacteriófagos..... 46

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Teste de sensibilidade aos antibióticos
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	Sociedade Torácica Americana
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CHEF	Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis
CHLO	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBP	Escovado brônquico protegido
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency
ESBL	β -lactamases de Espectro Alargado
FDA	Food and Drug Administration
HEM	Hospital Egas Moniz
HSC	Hospital de Santa Cruz
HSFX	Hospital São Francisco Xavier
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infeciosas
kb	Kilobase
LBA	Lavado bronco-alveolar
MBL	Metallo- β -lactamase

MLST	Multilocus sequence typing
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
OXA	Oxacilinase
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAV	Pneumonia associada ao ventilador
PBP	Proteína de ligação às penicilinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USDA	United States Department of Agriculture
VISA	Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

I. Introdução

1. PAV

A pneumonia associada ao ventilador (PAV) consiste numa infeção que ocorre num doente internado nas unidades de cuidados intensivos (UCI) há pelo menos 48 horas, após a sua intubação endotraqueal e ventilação mecanicamente assistida (Centers for Disease Control and Prevention, 2012a). Numa definição mais completa, consta de uma doença onde o doente careça de um dispositivo para assistir e controlar a sua respiração continuamente, através de uma traqueostomia ou através de uma intubação endotraqueal, num período de 48 horas antes do início da infeção, inclusive do período de desmame (períodos progressivos onde se descontinua a ventilação)(Horan, Andrus e Dudeck, 2008). A ventilação assistida pode se classificar como não invasiva ou invasiva, sendo que na invasiva requer a introdução de um tubo endotraqueal (TET), tubo nasotraqueal ou tubo de traqueostomia no doente (Cawley, 2007).

O seu diagnóstico é baseado em critérios radiológicos, clínicos e microbiológicos (Park, 2005a). Ao contrário da pneumonia adquirida na comunidade o diagnóstico da PAV é difícil e é ainda objeto de grande debate.

A PAV constitui um subtipo de pneumonia nosocomial que ocorre em cerca de um em cada quatro doentes intubados, geralmente nos primeiros 4 dias da intubação (Majumdar and Padiglione, 2012). A sua classificação é feita de acordo com o tempo decorrido entre o início da ventilação mecânica e o surgimento da pneumonia. Segundo as normas da American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America (ATS e IDSA) a PAV de início precoce define-se como ocorrendo nos primeiros 5 dias após a intubação, normalmente possui um prognóstico mais favorável e é usualmente provocada por bactérias sensíveis aos antibióticos. A PAV de início tardio acontece após 5 dias da ventilação mecânica e é mais comum ser causada por agentes multirresistentes, estando consequentemente associada a um aumento da mortalidade e morbidade. O aumento da mortalidade encontra-se particularmente associado à bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (American Thoracic Society and Infectious Diseases Society, 2005). Contudo esta classificação não é consensual entre os diversos estudos (Park 2005b; Olaechea *et al.*, 2010).

A pneumonia nosocomial de início precoce é mais frequentemente causada por organismos sem resistências microbianas incluindo: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* e *Moraxella catarrhalis* (Moran, Rothman e Volturo, 2013). Depois de 5 dias de hospitalização ou em doentes hospitalizados recentemente com antibioterapia prévia, as infeções mais comuns são geralmente causadas por microrganismos multirresistentes: *Klebsiella* sp, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, estando associados a um aumento da mortalidade (Tabela I.1) (Park, 2005a).

I. Introdução

Tabela I. 1 - Agentes etiológicos causadores de PAV

Classificação da PAV	Bactéria
Início Precoce	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Haemophilus influenza</i>
	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	<i>S. aureus sensível à meticilina (MSSA)</i>
	<i>Klebsiella sp.</i>
Início Tardio	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Acinetobacter sp.</i>
	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>S. aureus resistentes à meticilina (MRSA)</i>

1.1 Diagnóstico

Clinicamente o diagnóstico inclui 3 grandes componentes: aparecimento de infiltrado pulmonar na radiografia torácica; presença de critérios de infecção respiratória como: síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) febre, taquicardia, leucocitose, etc.; ou o isolamento do microrganismo potencialmente causador. Tem havido um esforço para criar normas para o diagnóstico da PAV, o facto é que por mais abrangentes e multidisciplinares que possam ser essas medidas não traduzem a realidade clínica. Tornou-se então essencial uma estratégia microbiológica que possa complementar as outras vertentes e que permita um diagnóstico fiável. Os infiltrados pulmonares em doentes ventilados podem não ser os causadores da PAV, podem ser antes resultado de trauma (i.e contusão pulmonar), de congestão pulmonar ou da colonização do tubo endotraqueal e traqueia (Fishman *et al.*, 2008). Uma forma de ultrapassar este problema é através do uso de culturas quantitativas em amostras colhidas por broncofibroscopia como o LBA (lavado bronco-alveolar) e o EBP (escovado brônquico protegido). No entanto devido à especificidade destas técnicas foram desenvolvidas outras técnicas invasivas não dirigidas, rápidas e seguras, como principais alternativas de diagnóstico que incluem: um mini-LBA cego (procedimento não broncoscópico) ou um EBP sem controlo visual (Horan, Andrus e Dudeck, 2008). Existem ainda outras técnicas como a colheita de secreções traqueobrônquicas, biópsias brônquicas e pulmonares, hemoculturas e exame do líquido pleural, no entanto estes métodos de análise microbiológica são menos fiáveis podendo ser de baixa especificidade ou de baixa sensibilidade.

1.2 Epidemiologia

A vigilância epidemiológica é um instrumento essencial para avaliar o desempenho das instituições de saúde com respeito à prevenção das infeções nosocomiais e da segurança do doente.

Nos Estados Unidos da América as pneumonias nosocomiais ocorrem numa taxa de 5 a 10 casos por 1000 admissões hospitalares (Koenig e Truwit, 2006), aumentando a prevalência 3 a 10 vezes em doentes que recebem ventilação mecânica (Chastre e Fagon, 2002). A pneumonia nosocomial é a infeção hospitalar mais prevalente em Portugal, sendo a mais comum nas UCI (Pina, Silva e Ferreira, 2010).

Um estudo nacional que resultou no relatório do inquérito de prevalência de infeção, do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infeção Associada aos Cuidados de Saúde revelou que em Portugal a prevalência das infeções nosocomiais nas UCI é de 39,7%, sendo então o serviço com maior incidência de infeções nosocomiais. No mesmo estudo identificou-se as vias respiratórias inferiores como a localização mais predominante com um valor de 33,2% (Pina, Silva e Ferreira, 2010). Mais recentemente realizou-se um inquérito de prevalência de infeção adquirida no hospital e do uso de antimicrobianos nos hospitais portugueses onde se verificou que as infeções das vias respiratórias inferiores continuam a ser as mais frequentes, com 620 infeções identificadas (em 2103), o que corresponde a uma taxa de prevalência de 3,4 (3,1-3,8) por 100 doentes internados, sendo que 80% destas infeções eram pneumonias (Pina *et al.* 2013).

A mortalidade nas UCI em doentes com PAV é elevada e estimada entre 30 a 70% (Vallés *et al.* 2007). Existe uma grande divergência de valores nos diversos estudos devido às diferenças nas amostragens, nos critérios utilizados, nas diferentes metodologias e na dificuldade que existe em obter um diagnóstico.

1.3 Etiologia

A PAV tem diversas causas que podem variar entre bacterianas, fúngicas e virais sendo estas raras e as fúngicas pouco comuns, só tendo um papel mais significativo quando o doente se encontra imunodeprimido. As infeções podem ser devidas apenas a um agente patogénico ou então a mais do que um - infeção polimicrobiana (Gvozdenović *et al.* 2012). A origem da infeção pode ser do tipo endógena estando fortemente associada à aspiração de secreções orofaríngeas, que resultam da colonização da orofaringe e da colonização gástrica (Park 2005a). Pode ser também de origem exógena a partir do ambiente, como por exemplo: material cirúrgico, dispositivos respiratórios contaminados, aerossóis e através dos profissionais de saúde ou de outros doentes (Safdar, Crnich e Maki 2005). Os agentes etiológicos variam conforme a área geográfica e a população em questão, mas os mais comuns são *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* sp. e *Streptococcus pneumoniae* (Jones, 2010).

I. Introdução

No inquérito de prevalência de infecção adquirida no hospital e do uso de antimicrobianos nos hospitais portugueses encontrou-se como principais agentes etiológicos das pneumonias, bactérias Gram-negativo não fermentativas (38,3%) onde estavam inseridas *P. aeruginosa* (51,9%) e *Acinetobacter* sp. (34,9%), seguido das bactérias Gram-positivo (28,9%) onde se encontra inserido o *S. aureus* (86,3%) (Pina *et al.*, 2013).

Quanto às diferenças dos agentes etiológicos causadores da PAV existe uma prevalência de microrganismos sensíveis na precoce: como *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, enquanto a de início tardio é frequentemente associada a microrganismos multirresistentes como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp. ou *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Os agentes etiológicos da PAV têm sido cada vez mais alvos de estudos, onde os resultados têm demonstrado que os microrganismos multirresistentes estão também presentes na PAV de início precoce, principalmente *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Restrepo *et al.*, 2013).

1.4 Tratamento

A terapia antimicrobiana da PAV é de grande relevância, pois se for inadequada está fortemente associada a um aumento da mortalidade, e quando mal administrada e em excesso leva a complicações, custos elevados e contribui para uma maior pressão antibiótica com emergência de resistências (American Thoracic Society and Infectious Diseases Society, 2005). Na prescrição de antibioterapia é necessário ter em consideração diversos fatores como por exemplo o tecido afetado. Estando envolvido o parênquima pulmonar a difusão dos antimicrobianos da corrente sanguínea para os pulmões e a sua penetração no tecido pulmonar é determinante na resposta ao tratamento (Park, 2005c).

Este paradoxo levou ao desenvolvimento de uma nova estratégia denominada de de-escalação terapêutica (Park, 2005c). A estratégia da de-escalação é agressiva e consiste num tratamento antimicrobiano precoce empírico de largo espetro que cubra todos os microrganismos potenciais, seguido de uma diminuição ou descontinuação dos antimicrobianos assim que os resultados dos testes de suscetibilidade estejam disponíveis. Quando se usa esta abordagem, as amostras microbiológicas são colhidas aquando do início de suspeita de PAV e a antibioterapia é iniciada imediatamente (Niederman, 2010). Como resultado, muitos doentes sem a doença são tratados desnecessariamente, e vários doentes com PAV posteriormente confirmada são tratados com antibióticos desnecessários. A utilização deste esquema de antibioterapia em todos os doentes com indícios de pneumonia leva a uma diminuição da especificidade do diagnóstico. Contudo alguns estudos já demonstraram em doentes com PAV, devidamente tratados, respostas clínicas favoráveis, um decréscimo na mortalidade e uma redução do tempo de internamento na UCI devido à terapia da de-escalação (Giantsou *et al.*, 2007).

Outro fator essencial a ter em conta no tratamento da PAV são os microrganismos presentes no tubo endotraqueal e que têm a capacidade de formar biofilmes. Algumas bactérias têm a capacidade de se juntar formando diversas camadas através de uma matriz polissacárida, o biofilme, as bactérias permanecem geralmente viáveis e metabolicamente ativas. O biofilme possui então um papel muito importante na patogenicidade da PAV pois coloniza o tubo endotraqueal, que facilita inoculações contínuas das vias respiratórias inferiores, pelas suas características de resistência muito elevadas em comparação com um microrganismo isolado (Adair *et al.*, 1999). O problema da falta de antibioterapia eficaz contra os biofilmes continua a ser alvo de estudo, têm sido estudados os mecanismos possíveis de resistência dos biofilmes aos antibióticos e os mais prováveis são a limitação da penetração do antibiótico no biofilme ou o microambiente criado dentro do biofilme que poderá inibir o antibiótico (Stewart e William Costerton, 2001).

Para a PAV de início precoce, na ausência de fatores de risco para patogénios resistentes é possível fazer um regime de monoterapia utilizando um antibiótico inicial empírico tal como: uma cefalosporina de 3^o geração, fluoroquinolona, ampicilina/sulbactam ou ertapenemo. No entanto para a PAV de início tardio o tratamento é principalmente baseado em antibióticos anti-*Pseudomonas* sendo também recomendado um esquema de combinação que incluía: cefalosporinas, carbapenemos, ou β -lactâmicos/inibidores da β -lactamase conjuntamente com fluoroquinolonas ou aminoglicosídeos (Vincent, Barros e Cianferoni, 2010).

Em doentes críticos mecanicamente ventilados pensa-se que o uso prolongado de agentes antimicrobianos favorece a seleção e subsequentemente a colonização das vias respiratórias por microrganismos multirresistentes. O uso de antibióticos de largo espectro mostrou igualmente promover a ocorrência de PAV a partir de estirpes resistentes: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. e MRSA (Fishman *et al.*, 2008).

1.5 Prevenção

A prevenção da PAV tornou-se uma questão de interesse pelos valores elevados de mortalidade e morbilidade a ela associada. Foi então necessário a implementação e divulgação de diretrizes para a prevenção e controlo desta doença por diversas entidades. A grande maioria dessas diretrizes baseia-se em normas padrão como lavar as mãos, usar luvas e dar formação às equipas hospitalares. Mas existem outras recomendações no âmbito da prevenção da PAV tais como: evitar a intubação endotraqueal se possível; elevar a cabeceira da cama em cerca de 30 a 45 graus (Van Nieuwenhoven *et al.*, 2006); a esterilização, desinfeção e manutenção do material invasivo (circuitos, ventiladores, filtros, tubo traqueal); o uso de tubos endotraqueais orais em vez de nasais; minimizar o tempo da ventilação mecânica assistida (Koenig e Truwit, 2006); nutrição entérica em vez de parentérica; pressão adequada do tubo endotraqueal para prevenir a regurgitação do conteúdo do estômago; vacinação pneumocócica de doentes em risco de adquirir pneumonia; prevenção da aspiração associada ao tubo endotraqueal; lavagem oral com cloro-hexidina; descontaminação oral e

I. Introdução

prevenção da colonização gástrica (Department of health and human services and Centers for Disease Control and Prevention, 2004). Num estudo internacional foi realizado um inquérito aos médicos das UCI onde se verificou que a prática de prevenção mais utilizada era a elevação da cabeceira da cama do doente, logo seguida da higiene de mãos e do controlo da pressão do tubo endotraqueal pelo menos de 24 em 24 horas (Lambert et al. 2013).

2. Género *Pseudomonas*

Pseudomonas são bacilos Gram-negativo anaeróbios não fermentativos. *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais patogénica na família *Pseudomonadaceae* e está identificada como um Gram-negativo reto ou um bacilo ligeiramente curvado (Murray et al., 2003). Produtora de diversos pigmentos, como a piocianina e a pioverdina, pode também crescer em variados meios devido à sua capacidade de metabolizar um largo espetro de fontes de carbono e quando isolada em placa exhibe um odor característico frutado. Cresce melhor aerobicamente mas também pode crescer anaerobiamente na presença de nitrato como aceitador final de eletrões.

Não fermenta carboidratos mas produz ácido a partir de açúcares como a glucose, frutose, xilose. É oxidase positiva e distingue-se das outras *Pseudomonas* pois consegue crescer a 42°C. Um meio seletivo comum utilizado é a cetrimida que contém um detergente que inibe o crescimento de alguns microrganismos. Apresenta um único flagelo polar, muitas fimbrias e pili na membrana celular (R. Murray, A. Pfaller e S. Rosenthal, 2003).

Em clínica é primariamente encontrada como patogénio nosocomial, o que reflete a sua grande propensão para crescer numa variedade de ambientes com componentes nutricionais mínimos. É uma espécie ubíqua encontrada no solo, na água, nas plantas e ocasionalmente pode ser associada a uma colonização de animais e humanos saudáveis. Nos hospitais pode colonizar superfícies húmidas e doentes nas axilas, ouvidos e períneo.

É um patogénio que possui vários fatores de virulência sendo intrinsecamente resistente a várias classes de antibióticos (Sadikot et al., 2005) sendo cada vez mais isolado de surtos epidémicos com características pan resistentes (resistente a todas as classes de antibióticos exceto a colistina e polimixina) (Deplano et al., 2005). Devido então ao surgimento destas pan resistências a comunidade médica está agora a recorrer à colistina e polimixina que foram descartadas há décadas atrás mas agora são consideradas drogas do século XXI (Stein e Raoult, 2002).

3. Género *Acinetobacter*

Acinetobacter são cocobacilos Gram-negativos não-fermentativos frequentemente dispostos aos pares, aeróbios estritos, oxidase negativa usualmente nitratos negativo e imóveis (ocasionalmente mostram motilidade). Durante a fase de crescimento têm forma de bacilo e na sua fase estacionária, de cocobacilo, são geralmente encapsulados.

Acinetobacter baumannii é uma espécie que oxida a glucose sendo versátil pois tira partido de uma panóplia de fontes de carbono e de energia. É não hemolítica, (M. de la Maza *et al.*, 2007) apresenta colónias não pigmentadas mas mucoides, exceto em meio de MacConkey onde as suas colónias apresentam uma coloração rosada. São catalase positiva e indol negativo. Originalmente pertenciam à família *Neisseriaceae* porque na coloração gram assemelhavam-se à família *Neisseria* sp. mas mais tarde foram colocados na família *Moraxellaceae* (Mandell, Bennett e Dolin, 2010). Estão distribuídos pelo meio ambiente e hospitalar sendo uma bactéria oportunista que coloniza doentes imunodeprimidos.

São saprófitos ubíquos, sobrevivem em superfícies húmidas, incluindo equipamento médico respiratório e em superfícies como a pele. Fazem parte também da flora normal orofaríngea e podem causar diversas infeções severas como: pneumonia; endocardite; meningite; infeções do trato urinário e de feridas.

É o segundo microrganismo não fermentativo mais isolado do Homem (R. Murray, A. Pfaller e S. Rosenthal, 2003). Recentemente tem sido mais reconhecido como importante causa de infeções nosocomiais particularmente nas UCI (Di Popolo *et al.*, 2011). É facilmente transmitido de um doente para outro devido à sua capacidade de perdurar nas mãos dos profissionais de saúde, nas superfícies inanimadas e à sua capacidade de resistência inata a muitos antibióticos comuns (Mahgoub, Ahmed e Glatt, 2002). É um microrganismo patogénico nosocomial prevalente, especialmente em doentes que estão submetidos a ventilação mecânica e por isso está fortemente associado à PAV (Garnacho-Montero *et al.*, 2003).

Desde 1998 que é considerado como emergente e a sua resistência ao imipenem tem sido observada em isolados bacterianos hospitalares portugueses. A sua resistência aos carbapenemos foi demonstrada, num estudo português, ser devida ao surgimento de uma estirpe sobre pressão seletiva antimicrobiana e à propagação de um clone epidémico produtor de OXA-40 (oxacilinase com atividade de carbapenemase) (Da Silva, 2004). Estes dados só revelam a importância de implementar medidas de controlo hospitalar para diminuir os riscos de disseminação. Outros estudos revelam um aumento dramático da resistência de *Acinetobacter* sp. às cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos (Walsh, 2005). A terapia empírica para as suas infeções severas deve ser baseada em: carbapenemos (meropenem e imipenem) associados ao sulbactam, polimixinas, aminoglicosídeos como a ampicacina e tobramicina e tigeciclina (Fishbain e Peleg, 2010).

I. Introdução

4. Género *Staphylococcus*

Staphylococcus são cocos Gram-positivos que podem apresentar-se isolados, em pares, tétradas, cadeias curtas ou *clusters* em forma de cachos de uva. São imóveis, não formadores de esporos e usualmente catalase positiva. Não costumam apresentar cápsula e a maioria das espécies é anaeróbia facultativa.

A espécie mais virulenta é o *Staphylococcus aureus* que tem o seu reservatório natural nas narinas dos adultos e pele incluindo as axilas e o períneo (Mandell, Bennett e Dolin, 2010). É considerado uma das causas principais de morbidade e mortalidade em doenças infecciosas. É a causa principal de infeções da pele e tecidos moles, mas provoca também infeções sistémicas incluindo a septicémia, que pode resultar em infeções noutras locais tais como osteomielite, pneumonia, endocardite, podendo infetar qualquer órgão e tecido (M. de la Maza *et al.*, 2007).

Apresenta um grande risco para a saúde pública devido à sua resistência aos antimicrobianos, em particular à meticilina. *S. aureus* pode ser sensível à meticilina (MSSA) ou resistente (MRSA) e a sua resistência está codificada no gene *mecA*.

É um patógeno frequentemente isolado de doentes com PAV com fatores de risco associados. Demonstraram-se fatores de risco comprovados para a PAV causada por MSSA: a idade (mais novos), o coma traumático, problemas neurocirúrgicos e antibioterapia prévia administrada, principalmente quinolonas (Meyer, Schwab e Gastmeier, 2010). Como fatores de risco para a PAV causada pelo MRSA encontra-se: a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), a duração da ventilação mecânica, a administração de antibioterapia prévia, a idade avançada e o tratamento com corticosteroides (Rello *et al.*, 1994). A terapia para estas infeções deve consistir em lincosamidas, oxazolidinonas ou glicopéptidos (Liu *et al.*, 2011).

5. Resistências aos antimicrobianos

5.1 β -Lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos possuem uma característica comum crucial o seu anel β -lactâmico; este interfere com a síntese do peptidoglicano na parede celular (Figura I.1) bacteriana ligando-se às PBP (proteínas de ligação às penicilinas) resultando na lise celular. As bactérias adquirem vários mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, pode dever-se à permeabilidade das barreiras através da hidrólise pelas β -lactamases, aumento de sistemas de efluxo e da alteração das PBP prevenindo a ligação dos antibióticos (Figura I.1) (R. Murray, A. Pfaller e S. Rosenthal, 2003). As mutações nos genes que codificam para as β -lactamases levaram a que estas adquirissem atividade contra todas as penicilinas e cefalosporinas, sendo denominadas de β -lactamases de largo espetro (ESBLs). São

potencialmente problemáticas porque hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e o aztreonam. Como estão codificadas em genes móveis que podem passar de organismo em organismo consideram-se fortemente associadas a microrganismos multirresistentes (Bradford, 2001).

5.1.1 Penicilinas

As penicilinas são um grupo de antibióticos naturais e semissintéticos altamente eficazes e que apresentam uma baixa toxicidade (Murray *et al.*, 2003). O composto básico é um ácido orgânico com o anel β -lactâmico obtido a partir de *Penicillium* sp. diferindo as penicilinas umas das outras em várias maneiras possíveis, desde a sua via eficaz de administração como os seus diferentes alvos (R. Murray, A. Pfaller e S. Rosenthal, 2003). Algumas penicilinas foram combinadas com inibidores de β -lactamases de modo a tratar infeções causadas por bactérias produtoras de β -lactamases. Como inibidores dos β -lactâmicos existe o ácido clavulânico e compostos β -lactâmicos (i.e sulbactam e tazobactam) que possuem uma atividade antibacteriana fraca mas são inibidores potentes de muitas β -lactamases de classe A.

5.1.2 Cefalosporinas

São antibióticos β -lactâmicos que derivam do ácido 7-aminocefalosporânico, isoladas originalmente do fungo *Cephalosporium*. As cefalosporinas dividem-se em quatro gerações baseadas no seu espectro de ação. As cefalosporinas de terceira geração aumentaram a potência contra os bacilos Gram-negativos em comparação com as penicilinas e com as cefalosporinas de primeira e segunda geração; contudo para alguns compostos neste grupo a atividade contra os Gram-positivos foi reduzida. A quarta geração tem o espectro mais abrangente: por exemplo o cefepime tem atividade contra os bacilos Gram-negativo incluindo *P. aeruginosa* e mantém a sua atividade contra Gram-positivo. A terceira e quarta geração juntas são denominadas por cefalosporinas de largo espectro.

As AmpC são cefalosporinases diferenciadas de outras β -lactamases de largo espectro pela sua capacidade de hidrolisar cefamicinas e também cefalosporinas de largo espectro (Manchanda, 2003). Associam-se frequentemente a estirpes de *A. baumannii*, pois o cromossoma que codifica para a cefalosporinase é comum a todas as estirpes de *A. baumannii* assim como de *P. aeruginosa* (Bonomo e Szabo, 2006).

5.1.3 Carbapenemos

Os carbapenemos ligam-se com grande afinidade à maioria das PBP de grande peso molecular das Gram-negativo e Gram-positivo. Atravessam a membrana externa nas Gram-negativo através de uma proteína extracelular específica. As carbapenemases são enzimas que hidrolisam carbapenemos e outros β -lactâmicos e estão usualmente associadas a espécies multirresistentes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e a membros da família *Enterobacteriaceae* (Thomson, 2010).

As enzimas que medeiam a resistência aos carbapenemos podem dividir-se em serina- β -lactamases e em metalo- β -lactamases (MBL) que possuem um ião metálico no seu centro ativo. A disseminação

I. Introdução

dos genes MBL calcula-se que seja devido ao consumo de cefalosporinas de largo-espectro ou carbapenemos (Kyungwon Lee *et al.*, 2003).

Sabendo que os carbapenemos são frequentemente usados como antibióticos de último recurso para tratar infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes, é importante a detecção dos produtores de MBL antes da prescrição e administração de β -lactâmicos.

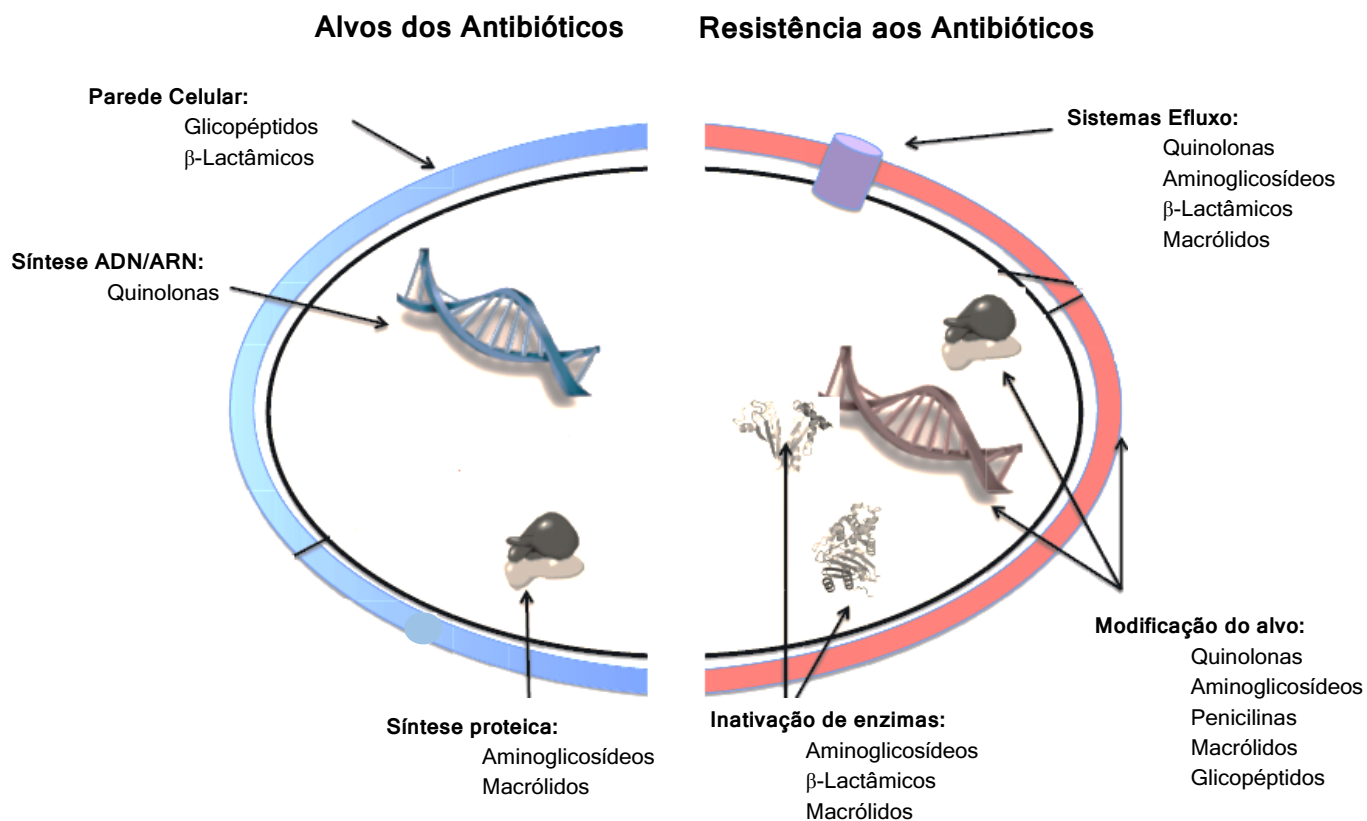


Figura I. 1 - Alvos dos antibióticos e mecanismos de resistência. Adaptado de Wright, 2010

5.2 Glicopéptidos

Os glicopéptidos são antibióticos que atuam na fase membranar da síntese do peptidoglicano (Figura I.1). A vancomicina originalmente obtida de *Streptomyces orientalis* é um glicopéptido que interrompe a síntese do peptidoglicano em bactérias Gram-positivo. A teicoplanina obtida de *Actinoplanes teichomyceticus* é similar em estrutura e no mecanismo à vancomicina mas apresenta menos efeitos secundários. São usadas em infecções graves para *Staphylococcus* resistentes à oxacilina ou outras bactérias Gram-positivo resistentes aos β -lactâmicos. A vancomicina tem sido tradicionalmente o tratamento de escolha para a PAV e outras infecções graves devidas a MRSA (Park, 2005c).

Alguns enterococos apresentam resistência inata ou adquirida aos glicopéptidos. Esta resistência encontra-se codificada num plasmídeo que pode ser transferido para *S. aureus* multirresistente. Este fenómeno é extremamente raro, apenas existindo casos descritos nalguns países como os Estados Unidos da América, o Brasil, a Jordânia e a Índia (Tiwari e Sem, 2006). Ainda não se tinham descrito casos na Europa, contudo recentemente foi isolado um VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina) em Portugal (Melo-Cristino *et al.*, 2013).

5.3 Aminoglicosídeos

São agentes bactericidas que inibem a síntese proteica (Figura I.1) bacteriana por se ligarem irreversivelmente à subunidade 30S ribossomal interferindo com a síntese proteica. São frequentemente usados para tratar infeções graves causadas por bactérias Gram-negativo como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.

A resistência das bactérias a estes antibióticos pode ser devido a mutações no sítio de ligação ribossomal, diminuição da captação do antibiótico para a célula, aumento da expulsão do antibiótico para fora da célula ou por produção de enzimas inativadoras destes antibióticos (localizadas normalmente em plasmídeos, podendo encontrar-se em transposões ou integrões).

5.4 Macrólidos

São agentes bacteriostáticos que inibem a síntese proteica bacteriana (Figura I.1) por se ligarem irreversivelmente à subunidade 50S ribossomal. Entre diversos mecanismos de resistência aos macrólidos os mais relevantes são os sistemas de efluxo e a alteração do alvo que resulta de uma metilação do rRNA 23S, codificada pelos genes *erm*, alterando a afinidade destes antibióticos.

5.5 Quinolonas

São uma das classes mais utilizadas de antibióticos que tem um efeito bactericida. São agentes quimioterapêuticos sintéticos que inibem a síntese dos ácidos nucleicos, inibindo enzimas bacterianas (topoisomerasas) que são necessárias para a replicação, recombinação e reparação do ADN (Figura I.1). Estes antibióticos apresentam uma boa atividade contra bactérias Gram-positivo e negativo, no entanto, *P. aeruginosa*, MRSA e *Enterococcus* podem desenvolver resistência rapidamente. A resistência às quinolonas é mediada por mutações cromossomais nos genes que codificam os alvos de atuação das quinolonas (topoisomerasas bacterianas) alterando-se a afinidade para estes alvos, podendo ser mediada por proteínas codificadas pelos plasmídeos que bloqueiam a inibição das topoisomerasas bacterianas (Figura I.1).

6. Tipagem Molecular

As infecções nosocomiais são cada vez mais uma preocupação nas unidades de cuidados de saúde. No intuito de diminuir o número destas infecções é necessário identificar o agente e o seu padrão de disseminação. É então imprescindível a realização de uma análise correta e fiável. Existem disponíveis diversas técnicas laboratoriais para determinar como duas estirpes estão relacionadas.

6.1 Eletroforese em campo pulsado

Na eletroforese em campo pulsado (PFGE) o ADN genómico é comparado para determinar o grau de semelhança entre duas estirpes. É frequentemente considerado como uma técnica “*gold standard*” de tipagem de agentes patogénicos devido a ser fácil e direto na sua abordagem, uso e interpretação. É o método epidemiológico de tipagem mais comum nas bactérias associadas aos cuidados de saúde, pois pode ser utilizado para uma vasta gama de agentes patogénico (Foley *et al.*, 2011). A sua principal vantagem é a capacidade de diferenciação baseada na restrição e separação do ADN do genoma total bacteriano.

O tamanho do cromossoma bacteriano é na ordem das megabases, logo os métodos eletroforéticos convencionais foram postos de parte pela sua incapacidade de separar fragmentos maiores que 40 a 50 kb. Surgiram então métodos alternativos como o *field inversion gel electrophoresis* (FIGE) que trabalha invertendo periodicamente a polaridade dos elétrodos durante a eletroforese, o *transverse alternating field electrophoresis* (TAFE) que utiliza uma geometria complexa entre os elétrodos e o gel colocado verticalmente (Gardiner, Laas e Patterson, 1986), o *rotating gel electrophoresis* (RGE) no qual os elétrodos estão posicionados de lados opostos da câmara e o gel é colocado numa placa circular (Serwer e Dunn, 1990) e, por fim, o *contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis* (CHEF). Apesar das diferentes configurações do equipamento, todos estes métodos se baseiam num princípio comum de um campo eletroforético com pulsos em direções diferentes num dado intervalo, o que permite que até moléculas de grandes pesos moleculares possam ser separadas (Persing *et al.*, 2004). É uma técnica na qual a matriz de agarose é submetida a variações periódicas do campo elétrico, fazendo com que os fragmentos do ADN consigam passar por zonas de menor resistência ao longo da sua migração no gel (Riley, 2004).

O CHEF (Figura I.2) tornou-se claramente a técnica padrão para o PFGE (Persing *et al.* 2004). Esta técnica consiste numa série de elétrodos dispostos hexagonalmente (24 elétrodos), de voltagens fixas e específicas à volta do gel, originando campos elétricos alternados com uma reorientação constante de um ângulo de 120° para gerar um campo elétrico homogéneo em todo o gel. A reorientação do campo no caso do CHEF é conseguida eletronicamente mudando os potenciais dos vários elétrodos, o que permite obter linhas retas e de mais fácil análise (Burmeister e Ulanovsky, 1992).

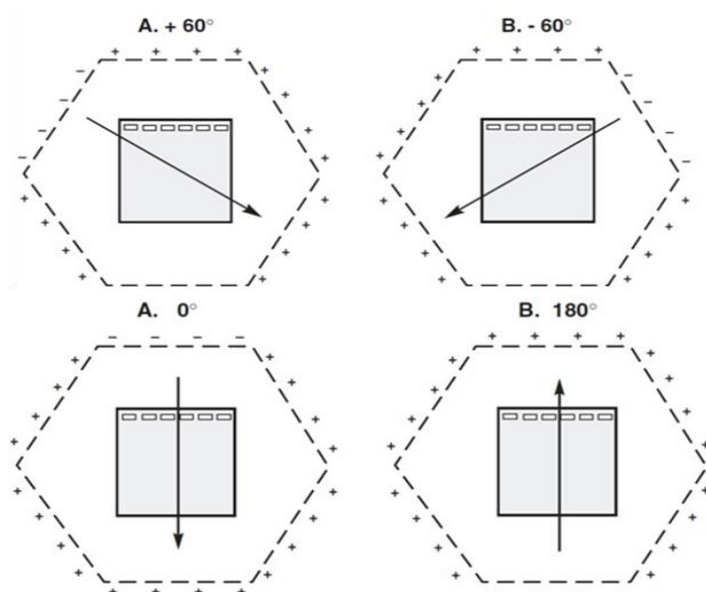


Figura I. 2 - Representação esquemática do CHEF. Retirado de Bio-Rad 2000

A sua reprodutibilidade entre laboratórios tem aumentado e tornou-se uma técnica de controlo bastante utilizada na indústria alimentar, principalmente depois da criação do programa PulseNet que possui uma base de dados com os principais microrganismos patogénicos alimentares (Centers for Disease Control and Prevention, 2012b). É também cada vez mais utilizado para comparar estirpes de *A. baumannii* (Durmaz *et al.*, 2009), *P. aeruginosa* (Syrmis, 2004) e *S. aureus* (Prevost, Jaulhac e Piemont, 1992), por ter um protocolo rápido, reprodutível, mais rentável e de rápida obtenção de resultados.

6.2 Outras técnicas

Multiple locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) utiliza a variabilidade do número de sequências curtas de repetição em tandem para criar perfis de ADN para estudos epidemiológicos em apenas três passos: o primeiro é uma reação em cadeia da polimerase (PCR); o segundo, uma fase onde se determina o tamanho dos fragmentos do ADN bacteriano; e por fim a análise dos resultados (Centers for Disease Control and Prevention, 2012c). É uma técnica que apresenta dificuldades em tratar posteriormente as relações genéticas entre estirpes, ao contrário do PFGE (Schouls *et al.*, 2009).

A técnica de *multilocus sequence typing* (MLST) utiliza-se como ferramenta taxonómica e baseia-se na sequenciação e comparação de cinco a sete genes *housekeeping*. Os diferentes alelos de cada gene definem o perfil alélico ou o tipo de sequência (Persing *et al.*, 2004). Quando comparadas as técnicas de MLST e PFGE, através do cálculo do índice de diversidade de Simpson os valores D (índice de Simpson) foram de 0,975, e 0,999 respetivamente. Embora ambos estes métodos tenham

I. Introdução

elevadas capacidades de discriminação, o PFGE consegue distinguir mais tipos (Johnson *et al.*, 2007).

O método de análise de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) baseia-se na hidrólise do ADN (plasmídico ou cromossômico) com endonucleases de restrição seguida de uma corrida eletroforética em gel de agarose para separar os fragmentos de ADN (Pourzand e Cerutti, 1993). Apresenta uma grande dificuldade em interpretar padrões obtidos que pode ser ultrapassada usando endonucleases que reconheçam sequências com um local raro de restrição. No entanto, geram-se grandes fragmentos de ADN com $\geq 25,000$ pares de bases (kb) que em eletroforeses convencionais não conseguem ser separados, sendo então necessário usar uma técnica que permita uma melhor resolução como o PFGE (Riley, 2004).

7. Bacteriófagos

7.1 Introdução

Os bacteriófagos são vírus que infetam somente bactérias. São frequentemente denominados por fagos e foram descobertos simultaneamente no início do século XX, por Frederick William Twort em 1915 e, por Félix Hubert d'Hérelle em 1917 (Ackermann, 2003). Os bacteriófagos podem ser virulentos (líticos) ou temperados e usar a bactéria hospedeira para a sua própria replicação (Petty *et al.*, 2007). São elementos genéticos extra-cromossomais que conseguem subsistir fora de uma célula hospedeira pois possuem um revestimento proteico que protege o seu genoma. Infetam as células bacterianas replicando-se e causando a lise da célula (infecção lítica) ou então integram-se no genoma hospedeiro sem o destruir (estado lisogénico) (Figura I.3) (R. Murray, A. Pfaller e S. Rosenthal, 2003).

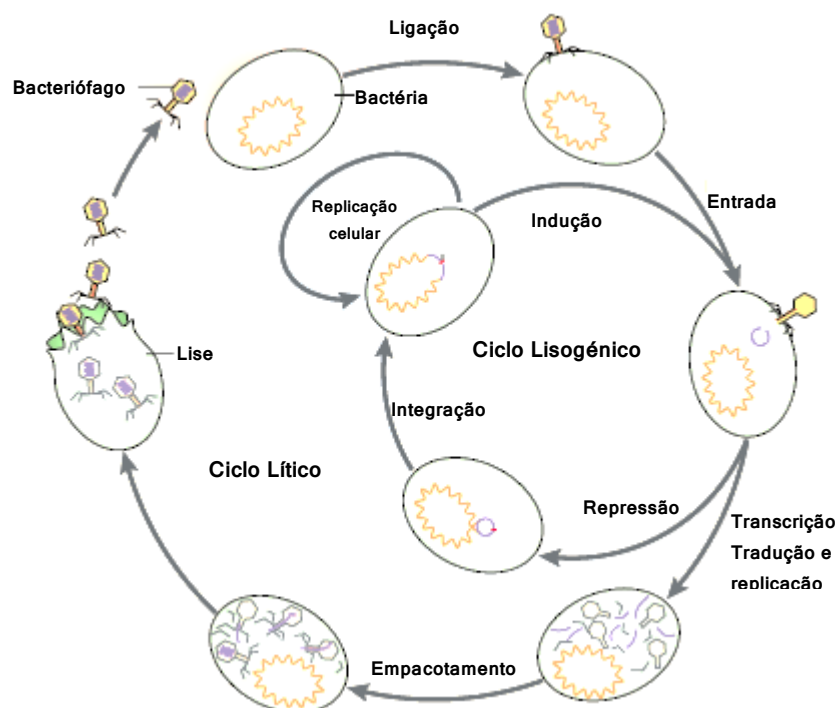


Figura I. 3 - Ciclo celular de um fago temperado. Adaptado de Campbell, 2003

Os genomas dos bacteriófagos podem ser compostos por ADN ou ARN de cadeia simples ou dupla de tamanho variável até 100 kb. Possuem genes essenciais característicos que lhes permitem utilizar a maquinaria da célula hospedeira, e genes que codificam para as proteínas que empacotam o ADN na cápside (Frost *et al.*, 2005). Os bacteriófagos utilizam basicamente duas estratégias para escaparem ao seu hospedeiro: os filamentosos codificam para um aparelho de secreção sofisticado conseguindo sair da célula continuamente sem provocar um dano letal à célula; por sua vez os bacteriófagos não filamentosos terminam o seu ciclo com a lise total do seu hospedeiro e a libertação dos viriões para o exterior.

Sabe-se que a produção de viriões não apresenta nenhum benefício para a bactéria, no entanto um subconjunto no genoma do fago pode codificar para fatores de virulência, bem como proteínas virais essenciais, levando a que a produção destas possa melhorar a sobrevivência das bactérias (Boyd, Davis e Hochhut, 2001). Este mecanismo pode-se dar de duas maneiras: através da transferência de fatores de virulência para as bactérias que infetaram tornando-as mais resistentes, inclusive resistente ao próprio fago, ou transferindo genes das bactérias que infetaram para bactérias vizinhas (Abedon *et al.*, 2011).

Os bacteriófagos necessitam de um hospedeiro apropriado que consiste geralmente num grupo de bactérias de uma determinada espécie. Estão distribuídos ubiquamente e podem ser encontrados em qualquer tipo de ambiente onde as bactérias possam proliferar, sendo provavelmente a entidade biológica mais abundante no planeta Terra (López-Larrea, 2012). Novos bacteriófagos podem sempre ser isolados a partir do ambiente, mas em alguns casos podem ser isolados a partir de amostras clínicas (Pirnay *et al.*, 2010).

7.2 Aplicações

Os bacteriófagos filamentosos são ótimos para utilizar como veículos de clonagem. A clonagem e a construção de bibliotecas são facilitadas pela sua capacidade de isolar ADN de cadeia simples ou de cadeia dupla e pelo facto de estes fagos possuírem um genoma pequeno que permite inserções em regiões não essenciais (Barbas III *et al.*, 2001). As técnicas de *phage display* são utilizadas para identificar ligandos biológicos e para mapear epitopos (locais de reconhecimento molecular) (Sarikaya *et al.*, 2003). É uma técnica que utiliza bacteriófagos para obter novas proteínas e péptidos específicos que interajam com um alvo de uma doença específica conhecida. O objetivo é utilizar esta técnica como método de deteção rápida e eficaz de novos fármacos (Brekke e Sandlie, 2003).

Em vários estudos tem-se dado aplicações diferentes aos bacteriófagos como o uso de fagos líticos para reprimir o excesso de proliferação de bactérias filamentosas em estações de tratamento de águas residuais (Choi, Kotay e Goel, 2011), o seu uso para reduzir eficazmente a presença de agentes patogénicos de origem alimentar em alimentos frescos e transformados (Goodridge and Bisha, 2011) e até como veículos de vacinação (Haq *et al.*, 2012). São utilizados também para descontaminação (alimentos e instrumentos) (Goodridge e Abedon, 2003) e na terapêutica veterinária, existindo já resultados favoráveis no tratamento das otites caninas provocadas por *P. aeruginosa* (Wright *et al.*, 2009). Tem havido vários estudos a decorrer sendo as suas aplicações cada vez mais numerosas.

Outra aplicação em crescimento é o uso de lisinas como antibacterianos. As lisinas são enzimas altamente evoluídas produzidas pelos bacteriófagos para digerir a parede celular bacteriana e libertar a sua progenia. Usar as lisinas como antibacterianos eficazes é uma linha de investigação que poderá controlar os patogénios bacterianos, particularmente aqueles encontrados à superfície das mucosas humanas (Fischetti, 2008).

As preocupações com o aumento da incidência de resistência aos antibióticos tem levado os investigadores a procurarem novas metodologias de tratamento de infeções. Com resultados *in vitro* positivos, tem-se vindo a investigar a possibilidade de desenvolver bacteriófagos como uma arma terapêutica eficaz e segura. Já foram realizados estudos para testar a terapia fágica em modelos animais e até agora os resultados foram bastante promissores (Biswas, 2002).

7.3 Terapia fágica

A terapia fágica consiste no uso de bacteriófagos para infeções bacterianas de seres humanos ou de animais, com o objetivo de reduzir a carga bacteriana. A via de administração é variada podendo ser tópica, oral, ou por via sistémica (Goodridge e Abedon, 2003).

A terapia fágica nos primórdios da sua descoberta foi muito utilizada: em 1919 para tratar a disenteria; em 1921 para tratar infecções na pele provocadas por *S. aureus* (Frost *et al.*, 2005) e mais tarde os bacteriófagos foram comercializados e produzidos nos Estados Unidos revelando sempre grande eficácia no combate a diversas infecções (Sulakvelidze, Alavidze e Morris, 2001). Contudo, quando surgiram os antibióticos “era antibiótica” a produção dos bacteriófagos cessou nos países ocidentais (Sulakvelidze, 2011). Porém, continuaram a ser feitos estudos com os bacteriófagos na Europa de Leste e na União Soviética no instituto de Eliava e no instituto de Hirschfeld (Kutter *et al.*, 2010).

Os bacteriófagos demonstraram ter características que os tornam agentes terapêuticos potencialmente atrativos. São altamente específicos e muito eficazes na lise do alvo patogênico e são seguros. Isto pôde ser verificado quando foram utilizados em clínica na Europa de Leste e na antiga União Soviética (Kutter *et al.*, 2010). São igualmente rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de ameaças bacterianas recentes (Sulakvelidze, Alavidze e Morris, 2001). Não perturbam a flora normal, devido à sua especificidade com o hospedeiro e têm a capacidade de passar barreiras fisiológicas. Apresentam um potencial de desenvolvimento de novas resistências mais restrito pois por terem mecanismos diferentes dos antibióticos não exibem resistências cruzadas com os mesmos. Revelam um potencial ambiental baixo, são um produto natural recuperado do ambiente e não têm grande custo devido ao fácil isolamento (Loc-Carrillo e Abedon 2011).

Os bacteriófagos líticos deveriam ser utilizados como antibióticos pois as suas características são muito idênticas a estes no que toca à atividade antibacteriana, tendo em conta que possuem uma atividade notável de lise bacteriana (Sulakvelidze, Alavidze e Morris 2001). São conhecidos como agentes bactericidas pois quando infetam bactérias provocam a sua destruição, ao contrário de alguns antibióticos que são bacteriostáticos (inibem o crescimento celular bacteriano). Têm uma capacidade de se auto-replicar em zonas de grande densidade bacteriana, podendo aumentar a sua concentração devido à sua capacidade de replicação *in situ*, designado por tratamento ativo. No entanto pode-se também designar o tratamento como passivo, descrito farmacologicamente como dosagem convencional (Abedon *et al.*, 2011).

Os bacteriófagos temperados (lisogénicos) não são aconselháveis para as terapias fágicas, devido à possibilidade que estes têm de tornar as bactérias mais patogénicas, pois os fagos lisogénicos infetam as bactérias, sem as destruir, de modo a que possam produzir e libertar a sua progenia. Assim as bactérias sobrevivem, tendem a ser resistentes aos bacteriófagos lisogénicos que as infetaram e podem aumentar a sua virulência (Frost *et al.*, 2005). Outro fator preocupante consiste na possibilidade dos bacteriófagos lisogénicos adquirirem genes de resistência das bactérias que infetaram e transferi-los para futuras bactérias que possam infetar (Boyd, Davis e Hochhut, 2001).

Ao longo do tempo têm-se realizado diversos estudos em animais e até em humanos para provar a eficácia a sua eficácia contra infecções bacterianas. Efetuaram-se ensaios usando uma terapia fágica oral com o fago T4 de *Escherichia coli* onde não foram observados efeitos adversos significativos e cujos tratamentos foram bem tolerados (Bruttin e Brussow, 2005). Outros ensaios serviram para

I. Introdução

verificar a viabilidade dos bacteriófagos nos pulmões. A sua eficácia para eliminar as bactérias no interior dos pulmões sugere que é um método favorável e que necessita de mais investigação (Carmody *et al.*, 2010). Num estudo recente verificou-se que o uso de bacteriófagos como tratamento para infeções do trato respiratório superior e inferior é viável. Os resultados mostraram que os bacteriófagos não eram eliminados rapidamente nos pulmões e que conseguiam combater a infeção (Debarbieux *et al.*, 2010). Recentemente os mesmos autores observaram que durante os tratamentos com bacteriófagos não surgiram respostas pró-inflamatórias, sendo estas frequentemente usadas como argumento contra a terapia fágica, tendo sucesso no resgate de ratinhos com infeções letais (Morello *et al.*, 2011).

Um dos problemas apresentado pelos antibióticos é a sua baixa eficácia contra biofilmes e é neste âmbito que os bacteriófagos podem também ter um papel muito importante a desempenhar. Os biofilmes podem possuir uma arquitetura aberta com canais de água, que permite o acesso ao seu interior pelos bacteriófagos (Sutherland *et al.*, 2004). Vários modelos *in vitro* efetuados com biofilmes demonstraram que os bacteriófagos podem eliminar e infetar bactérias responsáveis por doenças pulmonares crónicas (Debarbieux *et al.*, 2010) e reduzir a formação de biofilmes formados por *P. aeruginosa* se forem utilizados como tratamento prévio de cateteres (Fu *et al.*, 2009). Já existem também formulações e aplicações versáteis que demonstraram ser eficazes contra biofilmes de *A. baumannii* (Thawal *et al.*, 2012), *S. aureus* (Kelly *et al.*, 2012) e *P. aeruginosa* (Harper e Enright, 2011).

A terapia fágica pode ter várias abordagens. Uma muito conhecida são os *phage banks* cujo fundamento tem como base uma coleção de vários bacteriófagos que diferem na sua gama de hospedeiros (*host-range*). É necessário realizar primeiramente o teste de suscetibilidade da bactéria ao fago, tornando esta abordagem específica entre fago e bactéria. São feitos ensaios *in vitro* para determinar se o fago infeta ou não a bactéria e se não infetar testa-se outro fago. Tem como desvantagem o facto de ser mais moroso devido à espera do resultado de suscetibilidade ao fago antes de iniciar o tratamento.

Surgiram então os cocktails fágicos que permitem o desenvolvimento e comercialização de formulações de bacteriófagos para o tratamento de espécies bacterianas específicas e com um maior potencial de eficácia antibacteriana dada a utilização de um maior número de bacteriófagos. Esta formulação é conhecida como politerapia, que pode ser vantajosa pois diminui substancialmente a probabilidade de evolução de resistências (Chan e Abedon, 2012). Esta abordagem permite que seja usada durante um período longo bem como numa área geográfica mais alargada. Existem diversos estudos que demonstram a viabilidade do uso de cocktails fágicos para controlo e prevenção de infeções descritas na área veterinária (Oliveira, Sereno e Azeredo, 2010) e humana (Fu *et al.* 2009). Já existem estudos que comprovam a eficácia de cocktails fágicos em infeções do pé diabético, esse cocktail tem a abrangência de três espécies distintas: *A. baumannii*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e os resultados foram muito promissores (Mendes *et al.*, 2013).

De futuro, a terapia fágica vai continuar a ser uma terapia alvo de investigação devido aos seus resultados promissores, à necessidade de criar novos medicamentos para combater estirpes cada vez mais resistentes e ao facto de no passado ter sido utilizada apresentando bons resultados.

Esta tese apareceu na sequência destes estudos que sugerem novas perspetivas para o tratamento de PAV através de uma nova terapia, a terapia fágica.

II. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado na Techophage, SA. em colaboração com o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (responsável Prof. Doutora Teresa Marques) do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO) (Diretora Dra. Esmeraldina Correia Júnior), o qual engloba os seguintes hospitais: Hospital de Egas Moniz (HEM), Hospital de São Francisco Xavier (HSFX) e Hospital de Santa Cruz (HSC).

1. População e amostra

1.1 População

Recolheram-se amostras de 32 doentes diagnosticados com pneumonia associada ao ventilador (PAV) e foram enviadas para a Techophage, SA. todas as estirpes isoladas pertencentes às seguintes espécies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*.

1.2 Duração

O estudo foi realizado num período de 13 meses (Julho de 2012 a Julho de 2013 inclusive) e neste tempo foram recolhidos um número total de 36 isolados bacterianos.

1.3 Critérios de elegibilidade

Doentes internados nas UCI, diagnosticados com pneumonia, com ventilação mecânica assistida e colonizados por umas das três bactérias em estudo.

É também importante referir que para cada doente apenas se isolou uma estirpe por espécie.

1.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra todos os doentes diagnosticados com tuberculose ou fibrose quística e todos aqueles que não preenchiam os critérios de elegibilidade.

1.5 Ética e confidencialidade

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental.

2. Recolha de informação

Foi realizado um estudo observacional onde se recolheu informação relativa a dados demográficos e clínicos dos doentes, nomeadamente: género, idade, antibioterapia prévia e no momento da colheita, hospital, tempo de internamento em enfermaria e o tempo de internamento na UCI até ao diagnóstico de PAV. Estes dados foram cedidos pela Dra. Cristina Toscano (investigadora responsável do projeto no CHLO) e os dados relativos à antibioterapia administrada aos doentes foram gentilmente cedidos

pelos Serviços Farmacêuticos do HEM. O presente trabalho constitui um estudo retrospectivo das estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*.

3. Isolamento, identificação e AST das bactérias

O processamento das amostras respiratórias para o exame microbiológico foi realizado pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do CHLO. O laboratório foi também responsável pelo isolamento e identificação dos microrganismos, assim como pela confirmação que o agente etiológico isolado seria o causador da PAV, sendo utilizados para tal critérios clínicos e microbiológicos (National Standard Method, 2009).

A suspeita de PAV é baseada numa série de critérios radiológicos e clínicos, definidos pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) (Centers for Disease Control and Prevention, 2012a). Posteriormente podem-se recolher vários tipos de amostra diferentes: lavados brônquicos alveolares (LBA); secreções respiratórias; secreções brônquicas e expetorações, para confirmar o diagnóstico. As diferentes amostras são processadas, sempre em câmara de fluxo laminar e o mais rapidamente possível, recorrendo-se ao crescimento em diferentes meios (i.e Gelose de Sangue e MacConkey) e a dois esfregaços (coloração pelo método de Gram e de Ziehl-Neelsen). Os resultados são observados ao microscópio e em placa após 24h, 48h e 72h (Tabela II.1).

Tabela II. 1- Critérios de validação dos diferentes tipos de amostra do trato respiratório inferior

Tipo de Amostra	Leitura		
	Células epiteliais pavimentosas	Nº Leucócitos/campo (x10)	Colónias
LBA	<1%	<10	>10 ³ UFC/mL
		10-25	
		>25	
Expetoração	<10/campo	<10	Crescimento no 3º e 4º quadrante
Secreção Respiratória		10-25	
Secreção Brônquica		>25	

Para garantir a qualidade das amostras procedeu-se da seguinte forma: nos LBA considerou-se como boa amostra aquela que apresentasse menos de 1% de células epiteliais; nos restantes, nomeadamente secreções respiratórias colhidas por aspiração endotraqueal, expetorações e secreções brônquicas colhidas por fibroscopia, valorizaram-se as amostras com crescimento no 3º e 4º quadrante e desvalorizaram-se as amostras com mais de 10 células epiteliais/campo. Usaram-se também culturas semiquantitativas para as amostras respiratórias para descartar a hipótese de contaminação da amostra pelo trato respiratório superior, sendo um método que valida a qualidade da amostra discriminando entre microrganismos patogénicos e comensais (Ysenberg, 2004; Bartlett *et al.*, 2000).

Após a leitura dos resultados, os microrganismos valorizáveis de acordo com a clínica foram identificados e realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (AST). *A. baumannii* foi identificado através do sistema Vitek2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França), *P. aeruginosa* foi identificado através de características culturais e bioquímicas (teste oxidase positiva) e *S. aureus* pelo

II. Materiais e Métodos

teste da coagulase. A identificação de *S. aureus* resistente à metilina foi efetuada por meio do SLIDEX MRSA Detection (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).

Os AST foram realizados pelo método automatizado Vitek2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França), à exceção da amicacina e da vancomicina que foram realizadas pela técnica do Etest (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Depois da confirmação do diagnóstico e do agente causador, as estirpes foram enviadas para o laboratório da Techphage. À sua chegada foram repicadas em meio de *Tryptic Soy Agar* [TSA (Biokar Diagnostics, Saint-Malo, França)] em triplicado, incubadas à temperatura de 37°/18h, e posteriormente inoculadas em meio *Tryptic Soy Broth* [TSB (Biokar Diagnostics, Saint-Malo, França)] suplementado com 15% (V/V) glicerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e conservadas a -80°.

4. Métodos de Biotipagem

4.1 Testes Fenotípicos

Os testes fenotípicos são aqueles que permitem identificar as características observáveis das estirpes e que não realizam uma análise dos ácidos nucleicos. Neste caso em particular os testes fenotípicos aplicaram-se para a identificação de mecanismos de resistências aos antimicrobianos dos diferentes isolados bacterianos.

Foram utilizados 7 antimicrobianos: 5 cefalosporinas: cefoxitina 30ug (2ªgeração), ceftazidima 30ug (3ªgeração), cefotaxime 30ug (3ªgeração), ceftriaxona 30ug (3ªgeração) e cefepime 50ug (4ªgeração); 1 carbapenemo: imipenemo 10ug e amoxicilina e ácido clavulânico 20/10ug.

4.1.1 Teste de sinergia de disco duplo (DDST)

Este teste foi desenvolvido para detetar estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL). O teste desenvolvido foi adaptado das normas descritas no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012), devido à falta de "guidelines" para as espécies em estudo: *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Thomson, 2010).

O protocolo utilizado foi adaptado a partir de estudos anteriores (Poirel *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006). Procedeu-se à preparação do inóculo com 1 colónia bacteriana isolada em TSA (Biokar Diagnostics, Saint-Malo, França), em 5mL de Mueller Hinton Líquido (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) durante o tempo necessário para atingir uma densidade ótica (DO) a 620nm de 0,08-0,1, é equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Fez-se uma sementeira por espalhamento com zaragatoa em Mueller-Hinton Agar (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementado com 250 μ g/mL de cloxacilina (De Champs *et al.*, 2002) e foram aplicados os seguintes discos de antibiótico (Oxoid, Hampshire, Reino Unido): ceftazidima (CAZ); cefotaxime (CTX); cefoxitina (FOX); ceftriaxona (CRO); cefepime (FEP) e amoxicilina/ ácido clavulâmico (AMC). Os discos foram colocados a 20mm do centro do disco de AMC (Figura II.1).

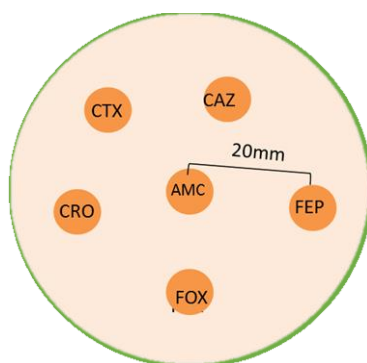


Figura II. 1 - Representação esquemática do DDST. CRO- ceftriaxona 30 µg; CTX- cefotaxime 30 µg; CAZ- ceftazidima 30 µg; FEP- cefepime 50µg; AMC- amoxicilina/ácido clavulânico 30 µg.

As placas foram incubadas a 37°C/18h, o diâmetro da zona de inibição à volta do disco foi medido e a interpretação dos resultados fez-se de acordo com os estudos referidos (Poirel *et al.*, 2003; Jiang *et al.* 2006).

As estirpes de controlo utilizadas foram *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

4.1.2 Teste Modificado de Hodge

O teste de Hodge foi adaptado de (Lee *et al.* 2003) com o intuito de detetar estirpes produtoras de metalo- β -lactamases. Resumidamente, fez-se uma sementeira por espalhamento com a estirpe indicadora *E.coli* ATCC 25922, 0,5, escala de MacFarland numa placa de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementada com 140µg de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot H_2O$; AppliChem, Darmstadt, Alemanha) e deixou-se 15min à temperatura ambiente. Após este período fez-se uma sementeira por espalhamento com a estirpe teste do centro da placa à periferia, colocando-se posteriormente um disco de 10µg-imipenemo no centro da placa e incubou-se a placa a 37°C/16h (Figura II.2).

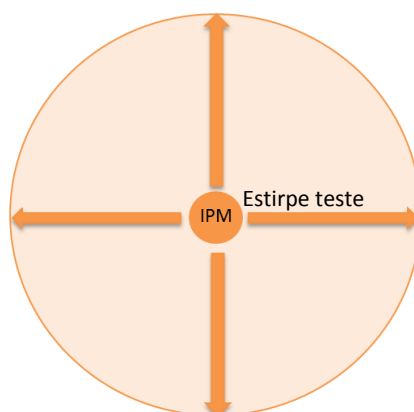


Figura II. 2 - Representação esquemática do teste modificado de Hodge. As setas representam os inóculos da estirpe a testar do centro da placa à periferia. IPM- imipenemo 10µg

II. Materiais e Métodos

Foi considerado como resultado positivo a presença de uma zona de distorção no halo de inibição pelo imipenem. Utilizaram-se como controlos negativo e positivo a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumonia* produtora de metalo- β -lactamases (gentilmente cedida pela Dra. Cristina Toscano) respetivamente.

4.1.3 Teste de sinergia com EDTA

O teste de disco duplo de sinergia com EDTA é um teste de rastreio de isolados produtores de metalo- β -lactamases. É um teste útil apenas para *P. aeruginosa*, sendo um método de fácil e rápida execução.

Para o respetivo teste inoculou-se uma placa de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) com a estirpe indicadora *E. coli* ATCC 25922, 0,5 na escala de McFarland até secar. De seguida colocou-se um disco de 10 μ g-imipenem e um disco de papel branco suplementado com 10 μ L de EDTA 0,5M/pH8.0 e 10 μ L da estirpe teste, a 10 mm um do outro (Figura II.3). As placas foram incubadas 16h/37 $^{\circ}$ e foi considerado como resultado positivo o aparecimento de uma zona de sinergia entre os discos. (Lee *et al.*, 2001) Utilizaram-se como controlos negativo e positivo a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumonia* produtora de metalo- β -lactamases, respetivamente.

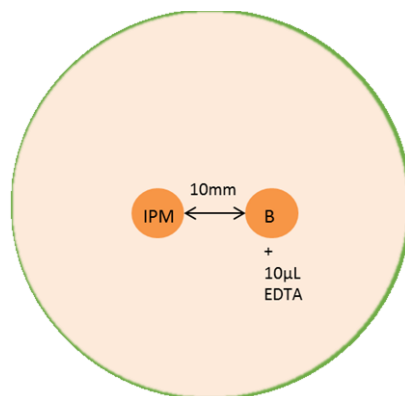


Figura II. 3 - Representação esquemática do teste de sinergia com o EDTA. IPM- imipenem 10 μ g; B- disco branco com EDTA e estirpe teste.

4.1.4 Teste tridimensional

O teste tridimensional descrito por Philip E. Coudron *et al.*(Coudron, Moland e Thomson, 2000) foi realizado segundo as alterações descritas por M. Shahid (Shahid, 2004) para identificar as estirpes produtoras de β -lactamases AmpC. Resumidamente, fez-se uma sementeira numa placa de Mueller-Hinton com uma suspensão da estirpe indicadora *E. coli* ATCC 25922, 0,5 na escala de McFarland, e deixou-se durante 15 min à temperatura ambiente. Seguidamente colocou-se um disco de 30 μ g-cefoxitina e fez-se cortes lineares a 5 milímetros do disco. Por fim recolheu-se a partir de uma placa de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) entre 5 a 8 colónias que foram inoculadas no corte com a utilização de uma ansa estéril (10 μ L), e as placas foram posteriormente incubadas 16h/37 $^{\circ}$ (Figura II.4). Considerou-se como teste positivo as placas que apresentavam uma distorção

por parte do organismo teste no halo de inibição da cefoxitina. Utilizaram-se como controlos negativo e positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumonia* produtora de AmpC, respetivamente.

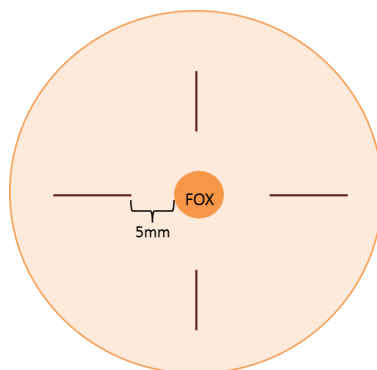


Figura II. 4 - Representação esquemática do teste tridimensional. Os cortes lineares, com as estirpes teste, fazem-se a 5milímetros do disco de cefoxitina (FOX).

4.1.5 Teste de disco AmpC

É um teste que pode ser utilizado como rastreio de estirpes produtoras de AmpC. O teste foi realizado conforme descrito por Kaur J. *et al.* (Kaur *et al.*, 2013). Em suma, fez-se uma sementeira homogénea em placa Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), com a estirpe indicadora *E.coli* ATCC 25922 numa escala 0,5 de McFarland. Colocou-se um disco de 30µg-cefoxitina e um disco branco de filtro, quase em contacto e inoculou-se a estirpe teste no disco branco (Figura II.5). As placas foram incubadas *overnight* a 37° e, quando observadas, considerou-se como positivo o crescimento da estirpe indicadora provocado pelo disco inoculado com a estirpe teste.

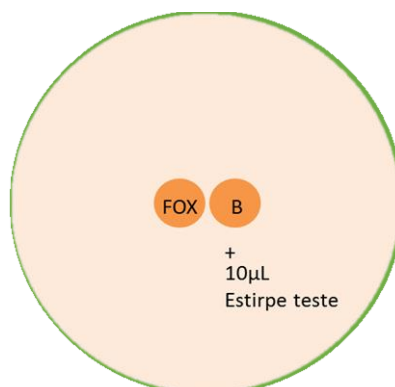


Figura II. 5 - Teste de disco AmpC. Disco de cefoxitina (FOX) e disco branco (B).

4.1.6 Teste de resistência à oxacilina

O teste de resistência à oxacilina é um método de rastreio fidedigno para a deteção de MRSA ou MSSA. O teste foi realizado numa placa de Mueller-Hinton Agar (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementada com 4% de NaCl e 6µg/mL de oxacilina, utilizando uma técnica de *spot* com uma ansa estéril de 10µL inoculada com a estirpe teste, suspensão esta que se encontra na escala 0,5 de

II. Materiais e Métodos

McFarland segundo as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Depois de inoculadas as placas são colocadas na estufa entre 32-35° durante 24h. O surgimento de qualquer crescimento na placa indica que a estirpe teste corresponde a um *S. aureus* resistente à oxacilina e consequentemente à meticilina (MRSA). Utilizaram-se como controlos positivos e negativos as estirpes indicadores *S. aureus* ATCC 43300 MRSA e ATCC 29213 MSSA respetivamente.

4.2 Tipagem Molecular por PFGE

A caracterização genotípica foi realizada recorrendo ao método de tipagem molecular PFGE, utilizando o aparelho CHEF-DR II System (Bio-Rad, Munique, Alemanha).

Para cada espécie foi necessário otimizar o protocolo de PFGE o que levou à realização de três protocolos díspares.

4.2.1 *P. aeruginosa*

A metodologia de PFGE para *Pseudomonas aeruginosa* foi adaptada a partir do protocolo descrito por Kaufmann (Kaufmann, 1998).

Extração de ADN e preparação de discos de agarose:

Inoculou-se uma colónia da cada estirpe em 5mL de meio líquido TSB (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e incubou-se a 37°C no agitador *overnight* a 135 rotações por minuto (rpm).

A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 5mL de tampão SE (25mM EDTA pH 8, 75mM NaCl) e novamente centrifugadas durante 10 minutos a 8000 rpm a 21°C. Em seguida ressuspenderam-se as células em 2,5 mL de SE a 4°C e a suspensão foi ajustada a uma densidade ótica na escala de MacFarland de 4 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).

Um volume de 250uL da suspensão celular foi equilibrado em banho-maria a 50 °C e adicionou-se igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) a 1,5% (p/v) em tampão SE a 50°. Esta mistura foi recolhida com uma seringa de 1mL sem agulha. Após 5m/-20°C e 10m/4°C, cortou-se a ponta da seringa e com uma lâmina estéril cortaram-se diversos discos (tamanho +- 1mm). Os discos de agarose foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15ml contendo 3mL de solução de lise gram-positivo [0.01M Tris (pH 8,0), 1M NaCl, 0,1M EDTA (pH7,5), 2% ácido desoxicólico, 5% n-lauroil-sarcosina, 5% Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter)], 100µg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 50µg/mL de ribonuclease A (RNase A) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e incubados a 37°C/5h.

A solução de lise foi substituída por 1mL de solução de lise gram-negativo (0,5M EDTA pH 9,0, 1% (m/V) n-lauroil-sarcosina), 1mg/mL de proteinase K (Applichem, Darmstadt, Alemanha) e os discos foram colocados a incubar durante 16h/50°C. Após remoção da solução anterior, procedeu-se à

lavagem dos discos deixando-os em 10mL de tampão TE 1X (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH8,0) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Os discos foram armazenados a 4°C em tampão TE 1X até posterior utilização.

Digestão com enzima de restrição *SpeI*:

A digestão do ADN cromossômico foi feita com *SpeI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Equilibraram-se os discos a 4°C/30m em tampão de reação, após a sua remoção foi adicionado ao microtubo com o disco, 100µL de novo tampão contendo 30 unidades de *SpeI* e a mistura foi incubada *overnight* (16 horas) a 37°C.

Electroforese em campo pulsado:

Os fragmentos de ADN cromossômico foram separados utilizando um gel de agarose a 1% (m/V) em tampão 0,5X TBE (Tris-borato-EDTA) (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). Como marcador de peso molecular utilizaram-se discos de Lambda *ladder* PFGE marker (New England Biolabs, Beverly, EUA). O aparelho de eletroforese utilizado para separar os fragmentos foi o CHEF-DR II (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). As condições de separação foram as seguintes: pulso inicial de 4,5 segundos; pulso final de 70 segundos; voltagem de 6V/cm; duração da corrida de 24h/14°C. Após a separação, o gel foi corado numa solução de 2,5µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) durante 1h, descorado em água bidestilada durante 1 hora, visualizado utilizando o transiluminador (Alphalmager HP, California, EUA) e fotografado com sistema Kodak EDAS 290 (Kodak, Rochester, New York, EUA). As fotografias foram guardadas para posterior análise.

4.2.2 A. baumannii

A metodologia de PFGE para *Acinetobacter baumannii* foi adaptada a partir do protocolo descrito por Kaufmann (Kaufmann, 1998).

Extração de ADN e preparação de discos de agarose:

Inoculou-se uma colónia da cada estirpe em 5mL de meio líquido TSB (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e incubou-se a 37°C no agitador *overnight* a 135 rpm..

A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 5mL de tampão SE (25mM EDTA pH 8,75mM NaCl), novamente centrifugadas durante 10 minutos a 8000 rpm (centrífuga) a 21°C. Em seguida ressuspenderam-se as células em 2 mL de tampão SE a 4°C e a suspensão foi ajustada a uma densidade ótica na escala de MacFarland de 4 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, França).

Um volume de 250µL da suspensão celular foi equilibrado em banho-maria a 50°C e adicionou-se igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) a 1,5% (p/v) em tampão SE a 50°. Esta mistura foi recolhida com uma seringa de 1mL sem agulha. Após 5m/-20°C

II. Materiais e Métodos

e 10m/4°C, cortou-se a ponta da seringa e com uma lâmina estéril cortaram-se diversos discos (tamanho +- 1mm). Os discos de agarose foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15ml contendo 3mL de solução de lise gram-positivo [0.01M Tris (pH 8,0), 1M NaCl, 0,1M EDTA (pH7,5), 2% ácido desoxicólico, 5% n-lauroil-sarcosina, 5% Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter)], 100µg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 50µg/mL de ribonuclease A (RNase A) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e incubados a 37°C/3h.

A solução de lise foi substituída por 1mL de solução de lise gram-negativo (0,5M EDTA pH 9,0, 1% (m/V) n-lauroil-sarcosina), 1mg/mL de proteinase K (Applichem, Darmstadt, Alemanha) e os discos foram colocados a incubar durante 16h/50°C. Após a remoção da solução anterior, procedeu-se à lavagem dos discos deixando-os em 10mL de tampão TE 1X (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH8,0) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Os discos foram armazenados a 4°C em tampão TE 1X até posterior utilização.

Digestão com enzima de restrição *ApaI*:

A digestão do ADN cromossômico foi feita com *ApaI* (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Equilibrou-se os discos a 37°C/30m em tampão de reação, após a sua remoção foi adicionado ao microtubo com o disco, 100µL de novo tampão contendo 30 unidades de *ApaI*, e a mistura foi incubada durante 2h/37°C.

Eletroforese em campo pulsado:

Os fragmentos de ADN cromossômico foram separados utilizando um gel de agarose a 1% (m/V) em tampão 0,5X TBE (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), utilizado como tampão de separação. Como marcador de peso molecular utilizaram-se discos de Lambda *ladder* PFGE marker (New England Biolabs, Beverly, EUA). O aparelho de eletroforese utilizado para separar os fragmentos foi CHEF-DR II (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). As condições de separação foram as seguintes: pulso inicial de 4 segundos; pulso final de 40 segundos; voltagem de 6V/cm; duração da corrida, 20h/14°C. Após a separação o gel foi corado numa solução de 2,5µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) durante 1h, descorado em água bidestilada durante 1h, visualizado utilizando o transiluminador (Alphalmager HP, California, EUA) e fotografado com sistema Kodak EDAS 290 (Kodak, Rochester, New York, EUA). As fotografias foram guardadas para posterior análise.

4.2.3 *S. aureus*

A metodologia de PFGE para *Staphylococcus aureus* foi adaptada a partir do protocolo descrito por Chung et al (Marilyn Chung et al., 2000).

Extração de ADN e preparação de discos de agarose:

Inoculou-se uma colônia da cada estirpe em 5mL de meio líquido TSB (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e incubou-se a 37°C no agitador *overnight* a 100 rpm.

A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 1mL de tampão PIV (0,01M Tris pH 8,0, 1M NaCl), novamente centrifugadas durante 10 minutos a 8000 rpm a 21°C. Em seguida ressuspenderam-se as células em 200uL de tampão PIV a 4°C e a suspensão foi ajustada a uma densidade ótica na escala de MacFarland de 4 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, França).

Um volume de 250uL da suspensão celular foi equilibrado em banho-maria a 42°C e adicionou-se igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) a 1,5% (p/v) em tampão PIV a 42°. Esta mistura foi recolhida com uma seringa de 1mL sem agulha. Após 5m/-20°C e 10m/4°C cortou-se a ponta da seringa e com uma lâmina estéril cortou-se diversos discos (tamanho +- 1mm), os discos de agarose foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15ml contendo 3mL de solução de lise gram-positivo [0.01M Tris (pH 8,0), 1M NaCl, 0,1M EDTA (pH7,5), 2% ácido desoxicólico, 5% n-lauroil-sarcosina, 5% Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter)], 100µg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 50µg/mL de ribonuclease A (RNAse A) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 50µg/mL de lisostafina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e incubados a 37°/4h.

A solução de lise foi substituída por 1mL de solução de lise gram-negativo (0,5M EDTA pH 9,0, 1% (m/V) n-lauril-sarcosina) e 1mg/mL de proteinase K (Applichem, Darmstadt, Alemanha) e os discos foram colocados a incubar durante 16h/50°C. Após remoção da solução anterior, procedeu-se à lavagem dos discos deixando-os em 10mL de tampão TE 1X (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH8,0) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Os discos foram armazenados a 4°C em tampão TE 1X até posterior utilização.

Digestão com enzima de restrição *Sma*I:

A digestão do ADN cromossômico foi feita com *Sma*I (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Os discos foram equilibrados a 30°C, em tampão Tango 1X (Fermentas, Vilnius, Lituânia), durante 1h. Após remoção do tampão, foi adicionado ao microtubo com o disco, 45µL de novo tampão contendo 15 unidades de *Sma*I, e a mistura foi incubada 16h/30°C.

Eletroforese em campo pulsado:

Os fragmentos de ADN cromossômico foram separados utilizando um gel de agarose a 1% (m/V) em tampão 0,5X TBE (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), utilizado como tampão de separação. Como marcador de peso molecular utilizaram-se discos de Lambda ladder PFGE marker (New England Biolabs, Beverly, EUA). Utilizou-se o aparelho CHEF-DR II (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) e as condições de separação foram as seguintes: pulso inicial de 5 segundos; pulso final de 35 segundos; voltagem de 6V/cm; tempo de separação, 23h/14°C. Após a separação o gel foi corado numa solução de 2,5µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) durante 1 hora, descorado com água bidestilada durante 1 hora, visualizado utilizando o transiluminador (AlphaImager HP, California, EUA) e fotografado com sistema Kodak EDAS 290 (Kodak, Rochester, New York, EUA). As fotografias foram guardadas para posterior análise.

5. Testes para determinar a atividade lítica dos bacteriófagos

Para a seleção de bacteriófagos com atividade lítica nas estirpes do estudo executaram-se os protocolos estabelecidos pela empresa Techphage S.A. e os bacteriófagos utilizados estão patenteados pela mesma, e foram os seguintes: bacteriófagos de *S. aureus* F125/10 e F44/10; bacteriófagos de *P. aeruginosa* F770/05 e F510/08 e o bacteriófago de *A. baumannii* F1245/05. (Mendes *et al.*, 2013) Foram incluídas no estudo as respectivas estirpes de propagação de cada bacteriófago: 743/06 de *S. aureus*; 433/07 de *P. aeruginosa* e 1305/05 de *A. baumannii*. Os testes dividiram-se em duas fases, onde na primeira se procedeu a um ensaio por *spot* para verificar se os bacteriófagos tinham capacidade de infectar as estirpes usadas no estudo. Para as estirpes que apresentassem halo de lise no local do *spot* prosseguia-se para a segunda fase onde se enumera os bacteriófagos pela técnica de dupla camada (double agar overlay plaque assays (Kropinski *et al.*, 2009)) com visualização de placas fágicas individualizadas.

5.1 Teste de infecção por *spot*

Neste teste prepararam-se culturas em meio líquido das estirpes em 5mL de TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) a 135rpm 16h/37°. Seguidamente fez-se um reinoculo destas culturas numa proporção de 1:50 para as estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e de 1:200 para as estirpes de *S. aureus*. Incubou-se as diferentes estirpes até atingirem uma densidade ótica a 600nm de 0,3-0,5. Para cada estirpe adiciona-se a tubos de vidro de 12 centímetros 200µL de cultura, para as estirpes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* e 150µL para estirpes de *A. baumannii*. A estes tubos acrescenta-se um meio (TSB) semissólido com 0,7% de agar suplementado com 10mM de MgCl₂ para estirpes de *P. aeruginosa* e de *A. baumannii*. Para as estirpes de *S. aureus* utiliza-se um meio (TSB) semissólido com 0,35% de agar suplementado com 5mM de MgCl₂ e CaCl₂. Por fim esta mistura é incorporada em placas de TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e deixado durante alguns minutos a solidificar à temperatura ambiente. De seguida coloca-se 5µL da suspensão d bacteriófago a testar diretamente na placa. Permite-se que a gota do bacteriófago seque e posteriormente coloca-se as placas na estufa a 37°/16h. Após o período de incubação observa-se o resultado. As estirpes sensíveis aos bacteriófagos apresentam um halo de lise no local da gota. Diferentes graus de transparência dos halos indicam diferentes eficácias dos bacteriófagos. Por estirpe podem ser testados vários bacteriófagos simultaneamente.

5.2 Teste de quantificação dos bacteriófagos

Prepararam-se culturas em meio líquido das estirpes do estudo e das estirpes de propagação dos bacteriófagos em 5mL de TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) a 135rpm 37°/16h. Seguidamente fez-se um reinoculo destas culturas numa proporção de 1:50 para as estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e de 1:200 para as estirpes de *S. aureus*. Incubou-se as diferentes

estirpes até atingirem uma densidade ótica a 600nm de 0,3-0,5. Perviamente são preparadas diluições seriadas em tampão fágico SM (50mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 8mM MgSO₄.7H₂O; 0,01% gelatina) de cada suspensão de bacteriófagos. Para cada estirpe adiciona-se a tubos de vidro de 12 centímetros 200µL de cultura, para as estirpes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* e 150µL para estirpes de *A. baumannii*. Acrescenta-se às culturas 100µL das diluições dos bacteriófagos e durante 20 minutos coloca-se os tubos na estufa a 37°.

A estes tubos adiciona-se um meio (TSB) semissólido com 0,7% de agar suplementado com 10mM de MgCl₂ para estirpes de *P. aeruginosa* e de *A. baumannii*. Para as estirpes de *S. aureus* utiliza-se um meio (TSB) semissólido com 0,35% de agar suplementado com 5mM de MgCl₂ e CaCl₂. Esta mistura é vertida sobre placas de TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) que incubam durante 16h/37°. No dia seguinte prossegue-se à contagem nas diferentes diluições do número de halos ou placas fágicas formadas (*pfu*, *plaque forming unit*) e calcula-se o respetivo título. Os títulos das estirpes em estudo foram comparados com os respetivos títulos das estirpes de propagação dos bacteriófagos.

6. Interpretação de resultados

6.1 Dendogramas

Para a análise comparativa dos perfis de restrição obtidos utilizou-se o programa informático *BioNumerics 7.1* (Applied-Maths, Austin, EUA). Utilizando o coeficiente de Dice, baseado na semelhança das bandas, com uma otimização 1,5% e tolerância de 1,1%, construíram-se três dendogramas diferentes um para cada espécie pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method by using average linkages*). Foi determinado um valor de *cut-off* para 80% de similaridade, pelo método de *cluster cut-off*. Considerou-se como estirpes pertencentes ao mesmo *cluster* aquelas que apresentassem um grau de semelhança igual ou superior a 80%.

6.2 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada no *software* SPSS para Windows (versão 19,0). As variáveis qualitativas foram expressas em percentagens e as quantitativas estão expressas em médias ± desvio padrão ou em medianas.

As significâncias das variáveis em estudo foram testadas utilizando correlações (utilizado para correlacionar variáveis) e o teste do qui-quadrado (utilizado para verificar se as variáveis são dependentes).

III. Resultados

1. Análise microbiológica

1.1 Caracterização sociodemográfica

Foram estudados no total 32 doentes internados nas UCI do CHLO diagnosticados com PAV. Recolheu-se um total de 36 isolados bacterianos em que a maioria (61,1%) foi proveniente do Hospital Egas Moniz (HEM), seguido (36,1%) do Hospital de São Francisco de Xavier (HSFX) e por fim apenas 1 isolado (2,8%) do Hospital de Santa Cruz (HSC) (Tabela III.1).

A faixa etária dos doentes variou entre os 24 anos e os 87 anos, sendo a média de $66,06 \pm 14,627$. A distribuição do género permite verificar uma similaridade entre doentes do sexo feminino (n=17) e do sexo masculino (n=19), com 47,2% e 52,7% respetivamente (Tabela III.1).

Tabela III. 1 - Caracterização da amostra dos doentes com PAV

	Espécies		
	<i>P. aeruginosa</i> (n=9)	<i>A. baumannii</i> (n=10)	<i>S. aureus</i> (n=17)
Dados Demográficos			
Sexo Feminino	4	4	9
Sexo Masculino	5	6	8
Idade (anos)	$71,9 \pm 6$	$71,4 \pm 8,6$	$65,2 \pm 16$
Hospital de proveniência			
HEM	5	9	8
HSFX	3	1	9
HSC	1	0	0
Classificação de PAV			
Tardia	6 (66,7%)	8 (80%)	9 (53%)
Precoce	3 (33,3%)	2 (20%)	8 (47%)

Quanto à classificação da PAV de início precoce ou tardio (diagnosticada antes e depois de 5 dias do início da ventilação) verificou-se que em relação aos 32 doentes 19 (59%) tiveram PAV de início tardio enquanto 13 (41%) tiveram de início precoce. Sendo que dentro da espécie de *P. aeruginosa* 33,3% das infeções foram classificadas de início precoce e 66,7% de início tardio, em *A. baumannii* 20% foram classificadas como de início precoce e 80% de início tardio e por fim dentro da espécie de *S. aureus* 47% correspondiam a início precoce e 53% a início tardio.

Analisando a hipótese de haver uma relação entre a espécie isolada e o género do doente pôde concluir-se que o género e a espécie não estavam diretamente relacionados, sendo os dados corroborados pela análise do qui-quadrado, que nos demonstra que as duas variáveis não são dependentes ($X^2 (2) = 0,460$; $p = 0,794$).

A amostra clínica mais utilizada na análise microbiológica foi a secreção respiratória (n=18) obtida por fibroscopia com uma predominância de 50% e a expetoração (n=4) como a menos comum (11,1%). A

diversidade do tipo de amostras clínicas não influencia os resultados pois em diversos estudos não foram descritas diferenças significativas entre os métodos invasivos ou não invasivos (Rea-Neto *et al.*, 2008; Fujitani e Victor, 2006).

A distribuição mensal dos isolados recolhidos está representada na Figura III.1; verificou-se um aumento significativo na estação do Inverno, com um isolamento de 20 (55,5%) estirpes: 7 (19,4%) em Dezembro, 4 (11,1%) em Janeiro, 5 (13,9%) em Fevereiro e 4 (11,1%) em Março.

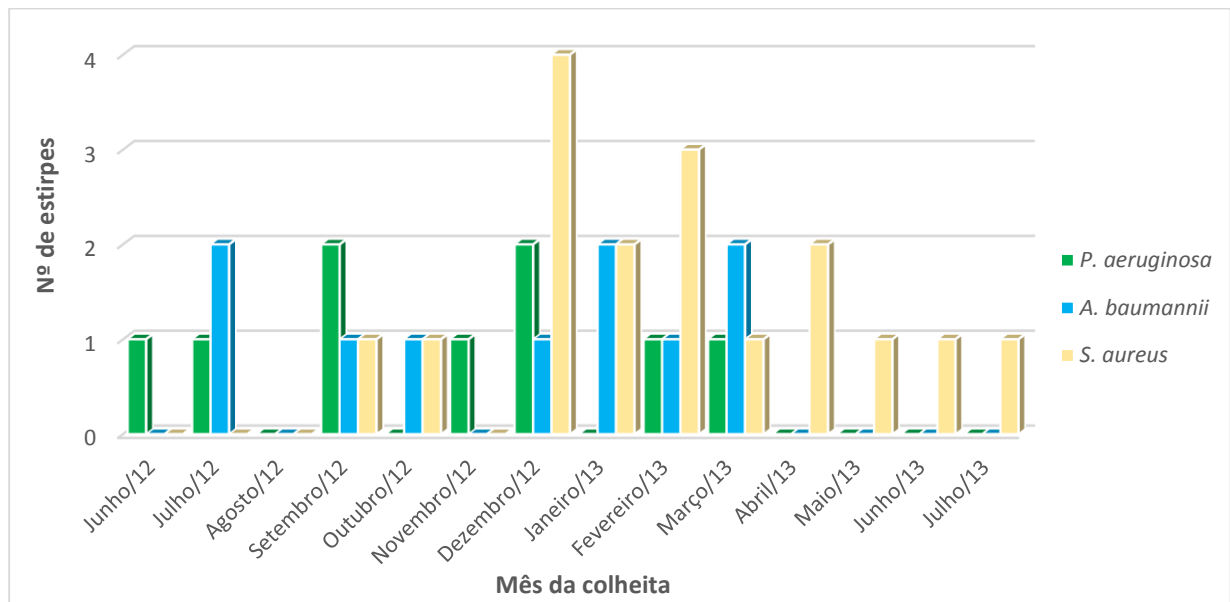


Figura III. 1 - Distribuição sazonal dos isolados recolhidos

1.2 Prevalência

Durante o período de estudo, reuniu-se a informação de todos os agentes etiológicos causadores de PAV isolados pelos hospitais pertencentes ao CHLO. As distribuições de todos os agentes encontram-se representadas na figura III.2. As três espécies escolhidas para o estudo apresentam uma distribuição de 56 (54,4%) num total de 103.

III. Resultados

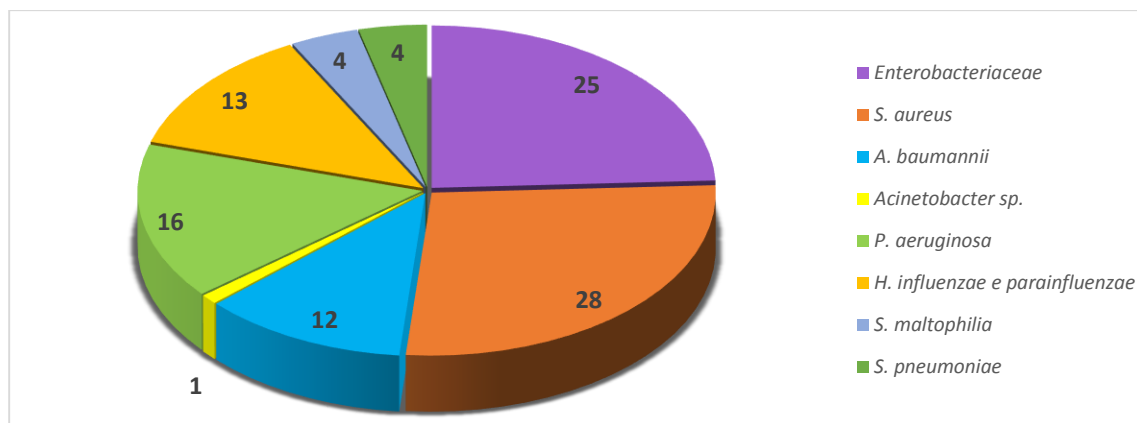


Figura III. 2 - Distribuição de todos os isolados bacterianos (n=103) causadores de PAV nas UCI do CHLO

1.3 Agentes etiológicos da PAV

Foram possíveis incluir no estudo 36 estirpes: 9 (25%) *Pseudomonas aeruginosa*, 10 (27,8%) *Acinetobacter baumannii* e 17 (47,2%) *Staphylococcus aureus* (Figura III.3). Dos 32 doentes com PAV, 4 (12,5%) apresentavam uma infecção polimicrobiana, enquanto os restantes 28 (87,5%) apresentavam uma infecção por apenas um organismo patogénico. Todas as infeções polimicrobianas foram causadas pela espécie *A. baumannii* juntamente com outra bactéria: MRSA ou *P. aeruginosa*.

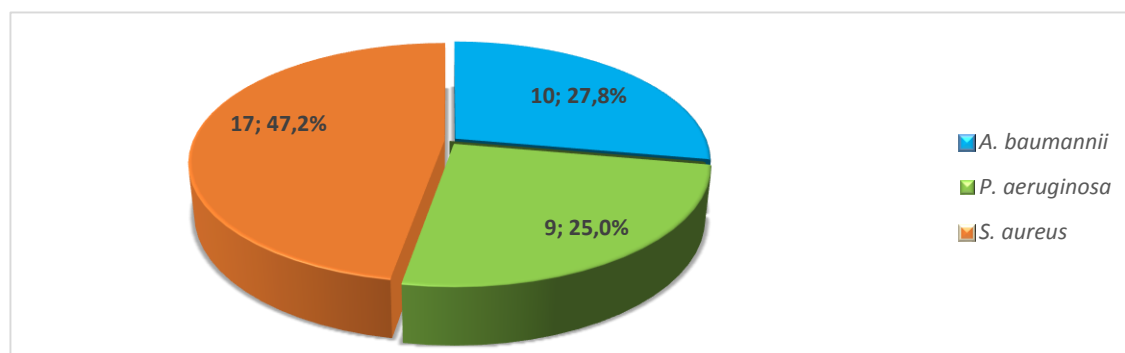


Figura III. 3 - Distribuição dos isolados bacterianos em estudo, causadores de PAV nas UCI do CHLO

1.4 Testes de suscetibilidade aos antibióticos

Das espécies em estudo, destaca-se *A. baumannii*, visto que 8 (80%) das suas estirpes são pan resistentes e as outras 2 (20%) são multirresistentes (Figura III.4). No que concerne a espécie *P. aeruginosa*, 3 (33,3%) estirpes são multirresistentes, no entanto todas as estirpes apresentam suscetibilidade aos aminoglicosídeos e à colistina (Figura III.4). Esta análise mostrou que nestas duas espécies existe 0% de resistência à colistina.

Quanto à espécie de *S. aureus* existem na amostra 13 MRSA (76,47%) e 4 MSSA (23,5%), todos suscetíveis à vancomicina, mupirocina, trimetoprim/sulfametoxazol e tetraciclina e resistentes às penicilinas (Figura III.5).

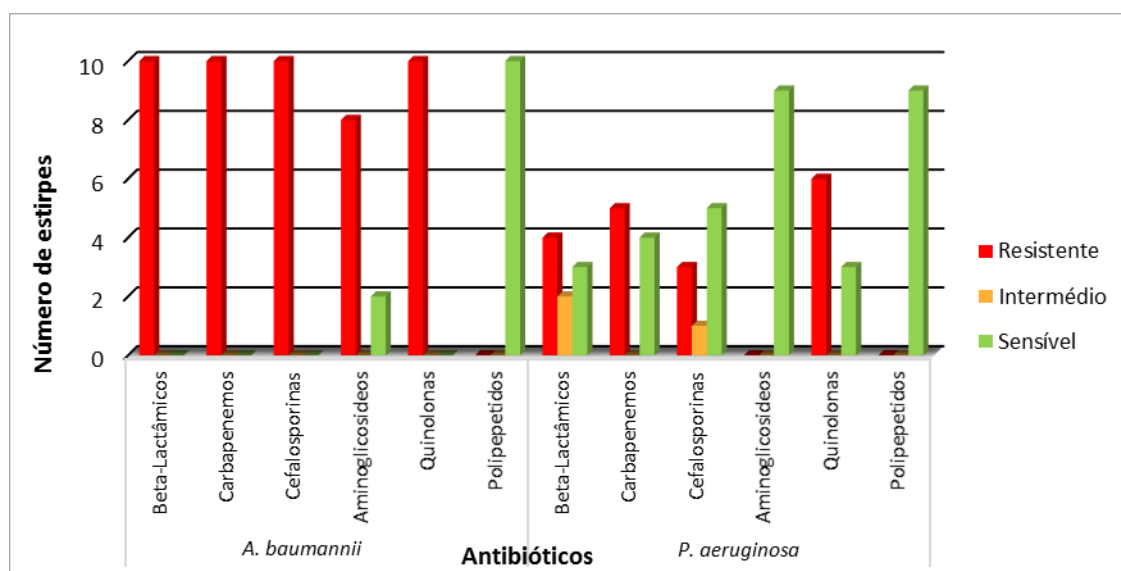


Figura III. 4 - Resistência das estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* aos antibióticos

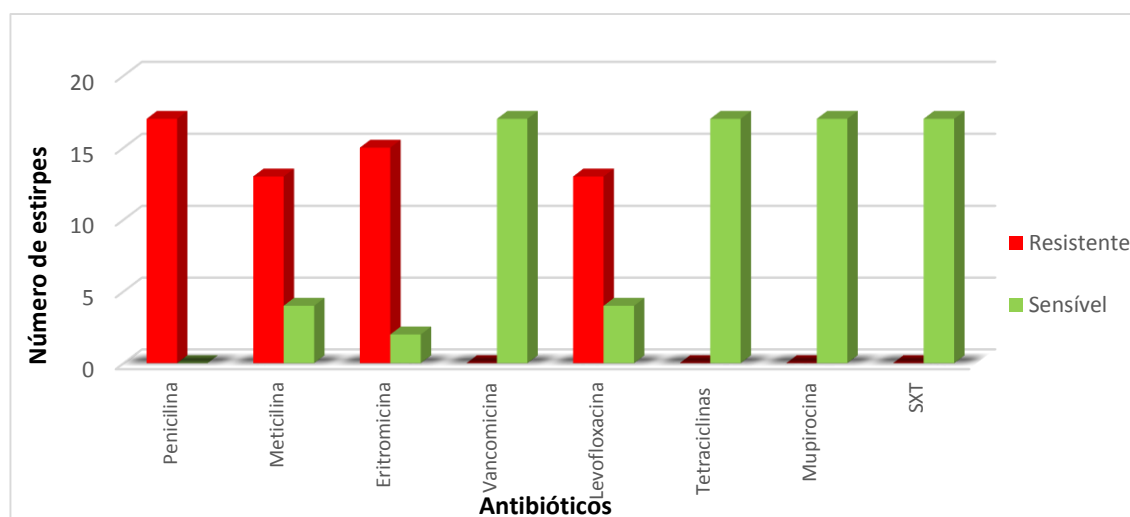


Figura III. 5 - Resistência das estirpes de *S. aureus* aos antibióticos

1.5 Tempo de internamento

Analisou-se a hipótese da idade do doente estar correlacionada com o tempo de internamento na UCI até ser diagnosticado com PAV. A análise feita tinha como âmbito averiguar se com o aumento de idade do doente o tempo de internamento até desenvolver a PAV diminuía. Verificou-se uma fraca correlação negativa ($R = -0,126$; $p = 0,478$), no entanto existe uma pequena dependência, embora não significativa, entre as duas variáveis. Pode concluir-se então existir uma tendência do tempo de internamento diminuir (até o surgimento de PAV) conforme a idade do doente aumenta.

Quanto ao tempo de internamento das UCI é visível que o *A. baumannii* é a espécie com um período mais longo (Tabela III.2) até o desenvolvimento da infeção. Por outro lado *S. aureus* é responsável

III. Resultados

por infecções mais precoces, havendo casos (53%) em que os doentes foram diretamente para as UCI (sem passarem por outras unidades) desenvolvendo imediatamente infecções por *S. aureus* (Tabela III.2). É possível verificar pela tabela III.2 que as espécies de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* demoram mais tempo a desenvolver a infeção (42 e 13 dias respetivamente), enquanto *S. aureus* é associado a infeções com menor tempo de internamento (8 dias).

Tabela III. 2 - Tempo (dias) de internamento nas diferentes unidades do Hospital

Espécie	Tempo de internamento (dias)								
	Enfermagem			UCI			Total		
	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana
<i>P. aeruginosa</i>	0	20	4	2	171	9	4	172	13
<i>A. baumannii</i>	0	40	4	2	97	14	5	100	42
<i>S. aureus</i>	0	55	0	2	58	5	2	58	8

1.6 Antibioterapia

Dos 32 doentes estudados, a maioria, 24 (75%), fez terapêutica antibiótica durante o seu internamento no hospital, previamente à data de colheita da estirpe patogénica responsável pela PAV, recebendo entre nenhum a sete antibióticos diferentes (mediana de 2 antibióticos administrados por doente) e a duração da terapêutica foi em média de 23 dias.

É visível pela tabela III.3 que a maioria das estirpes possui resistências aos antibióticos administrados com especial destaque às classes das: penicilinas, carbapenemos e quinolonas. Alguns doentes (n=9; 25%) não receberam terapia antimicrobiana previamente ao isolamento do seu microrganismo patogénico e quando observada a tabela III.3 verifica-se que mesmo as estirpes isoladas desses doentes possuem resistências aos antibióticos especialmente às classes de: penicilinas, macrólidos, carbapenemos, quinolonas, cefalosporinas e aminoglicosídeos. Esta análise permitiu-nos concluir que as resistências das estirpes em estudo possivelmente não estão relacionadas com a administração prévia de antibióticos, contudo, os resultados não são significativos ($p > 0.05$) devido à amostra ser pequena. Porém para as classes antibióticas de carbapenemos e cefalosporinas administradas às estirpes de *P. aeruginosa* os resultados foram significativos ($p < 0.05$) demonstrando que a terapia prévia com estes antibióticos poderá ter influenciado o desenvolvimento de resistências aos mesmos.

Tabela III. 3 - Nº de estirpes com antibioterapia prévia (AP) e sem antibioterapia prévia (AP) e as suas respetivas resistências (n)

Classes de Antibióticos	Espécies								
	<i>S. aureus</i> (n=17)		<i>p</i> ^a	<i>A. baumannii</i> (n=10)		<i>p</i> ^a	<i>P. aeruginosa</i> (n=9)		<i>p</i> ^a
	Sem AP	Com AP		Sem AP	Com AP		Sem AP	Com AP	
Peniclinas	10	7	ns	5	5	ns	0	2	ns
Macrólidos	11	5	ns	0	0	nd	0	0	nd
Carbapenemos	0	0	nd	5	5	ns	1	4	<0.05
Glicopéptidos	0	0	nd	1	0	ns	0	0	nd
Quinolonas	12	1	ns	5	5	ns	2	3	ns
Cefalosporinas	0	0	nd	7	3	ns	0	3	<0.05
Aminoglicosídeos	0	0	nd	7	1	ns	0	1	ns
Mupirocina	1	0	ns	0	0	nd	0	0	nd

‡Estirpes resistente sem antibioterapia prévia vs. Estirpes resistentes com antibioterapia prévia
ns- valor de p não significativo; nd- não determinado

2. Testes fenotípicos

2.1 ESBL

Os testes para detetar as estirpes produtoras de ESBL não foram conclusivos. Fizeram-se os testes com meio de Mueller-Hinton agar suplementado com 250µg/mL de cloxacilina de modo a inibir a atividade de estirpes produtoras de AmpC como descrito na literatura (Thomson, 2010; De Champs *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2003), mas apesar disso não foi possível tirar conclusões. Houve um ligeiro aumento no diâmetro dos halos provocado pelo ácido clavulânico mas nada significativo e passível de ser considerado um resultado positivo.

2.2 Teste Modificado de Hodge (MHT)

Entre os 19 isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* testados pelo teste modificado de Hodge (Figura III.6), 5 deram resultados positivos, 2 deram resultados inconclusivos e 12 deram resultados negativos. Quando se suplementou a placa de Mueller-Hinton com sulfato de zinco (140µg) (Lee *et al.* 2003) os dois resultados inconclusivos deram positivo, assim como mais 3 que tinham dado resultado negativo, perfazendo um número total (n=19) de 10 (52,6%) estirpes produtoras de metalo-β-lactamases. Das estirpes produtoras de metalo-β-lactamases verificou-se uma grande predominância de *A. baumannii*, com 8 dos 10 casos evidenciados (80%), existindo apenas 2 casos (20%) de *P. aeruginosa*.

III. Resultados

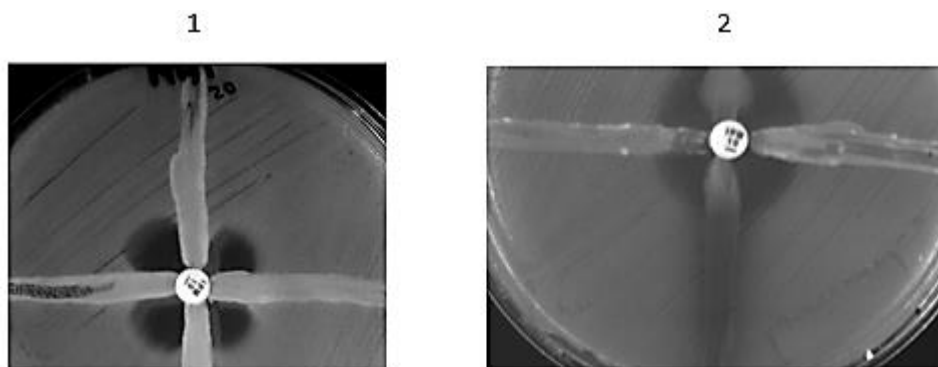


Figura III. 6 - Teste modificado de Hodge suplementado com sulfato de zinco (aspecto de trevo). 1- Da esquerda para a direita: controlo positivo; 2 estirpes (*A. baumannii*) produtoras de MBL. 2- Da esquerda para a direita: controlo negativo (ATCC 27853); 2 estirpes (*P. aeruginosa*) não produtoras de MBL.

2.3 Teste de sinergia com EDTA

Na primeira fase do teste (com EDTA e sem sulfato de Zinco) apenas 1 estirpe teve um resultado sinérgico positivo com o EDTA e duas estirpes tiveram resultados inconclusivos. Numa segunda fase adicionou-se ao disco de imipenem 10 μ L de sulfato de zinco (Lee *et al.*, 2003) e obtiveram-se duas (10,5%) estirpes de *P. aeruginosa* com zonas sinérgicas com EDTA (Figura III.7).

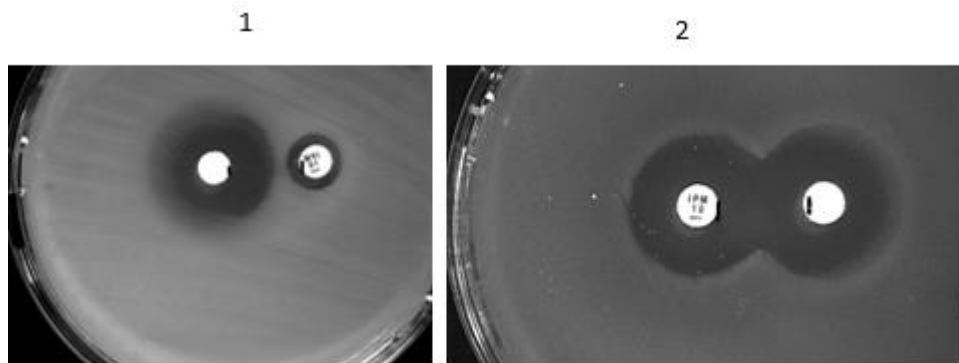


Figura III. 7 - Teste de sinergia ao EDTA. 1- Estirpe positiva de *P. aeruginosa* que mostra uma zona sinérgica de inibição entre o disco de imipenem e o disco de EDTA. 2- Controlo negativo (ATCC 27853) que não apresenta zona sinérgica. IPM- imipenem

2.4 Teste de disco AmpC

Neste teste com um disco de cefoxitina e um disco branco inoculado com a estirpe teste (Kaur, 2013), apenas 2 (10,5%) estirpes de *A. baumannii* deram resultados positivos e mostraram ser possíveis produtoras de enzimas AmpC (Figura III.8).

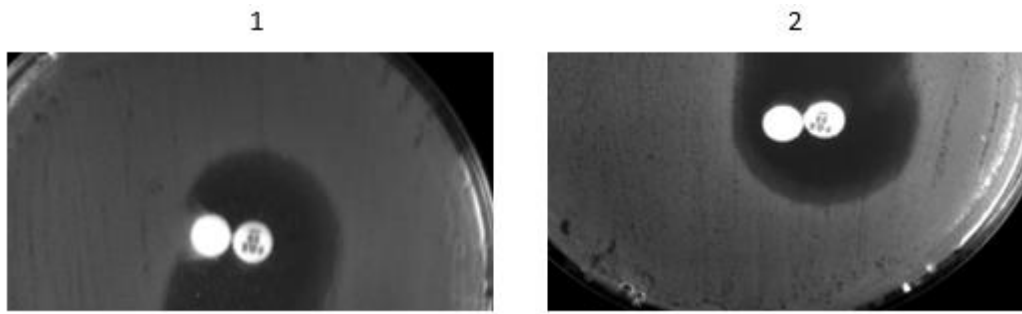


Figura III. 8 - Teste de disco AmpC. 1- Estirpe de *A. baumannii* com resultado positivo pois apresenta zona dentada à volta do halo de cefoxitina (FOX); 2- Estirpe de *A. baumannii* com resultado negativo.

2.5 Teste tridimensional (3D)

Foram analisados os 19 isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e 10 revelaram um resultado positivo (Shahid, 2004). Todas as estirpes com resultado positivo eram de *A. baumannii* correspondendo a 10 isolados que representam 58% de estirpes possíveis produtoras de AmpC (Figura III.9).

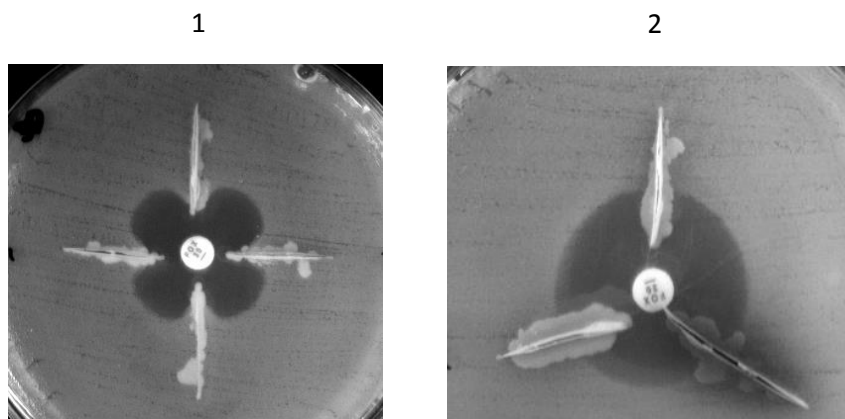


Figura III. 9 - Teste tridimensional. 1- Da esquerda para a direita: controlo positivo; 3 estirpes (*A. baumannii*) possíveis produtoras de enzimas AmpC. 2- Da esquerda para a direita: controlo negativo (ATCC 27853); 2 estirpes (*P. aeruginosa*) não produtoras de AmpC. FOX- cefoxitina

2.6 Teste da resistência à oxacilina

O teste *screening* de resistência à oxacilina (Figura III.10) foi realizado e os seus resultados foram 100% concordantes com os inicialmente obtidos através do SLIDEX MRSA *Detection* (Biomérieux). Das 17 estirpes de *S. aureus*, 13 (76,5%) são MRSA e 4 (23,5%) são MSSA confirmando uma alta prevalência de MRSA na amostra em estudo.

III. Resultados

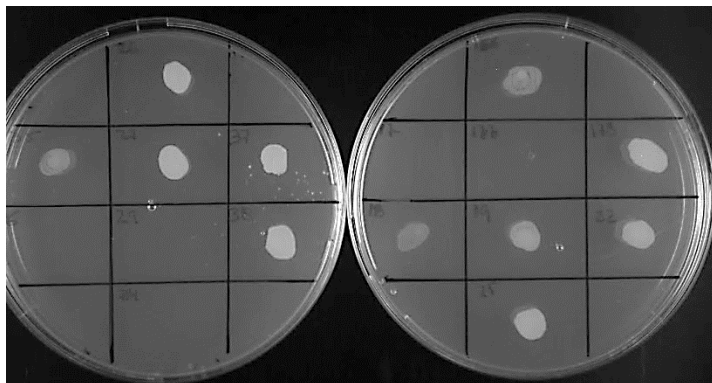


Figura III. 10 - Teste de resistência à oxacilina. Estirpes MRSA mostram crescimento em placa e estirpes MSSA não exibem crescimento em placa.

3. Tipagem Molecular

A análise dos perfis obtidos por PFGE utilizando o programa *Bionumerics* revelou que existem clones distintos responsáveis pela PAV. Os diferentes perfis gerados consideraram-se como clones se apresentassem mais de 90% de grau de similaridade. O número de estirpes presente em cada um dos clones variou consideravelmente.

3.1 Eletroforese em campo pulsado para *P. aeruginosa*

Existe uma grande variabilidade genética dentro da espécie *P. aeruginosa* (Figuras III.11 e III.12). A única estirpe proveniente do HSC é totalmente distinta das restantes, apresentando apenas 59,2% de similaridade. As restantes estirpes, provenientes do HEM e do HSFX apresentam entre si um grau de semelhança de 62,4%. As estirpes com grau de similaridade maior (82,1%) deram ambas um resultado positivo para a produção de metalo- β -lactamases e são provenientes do mesmo hospital (HEM).

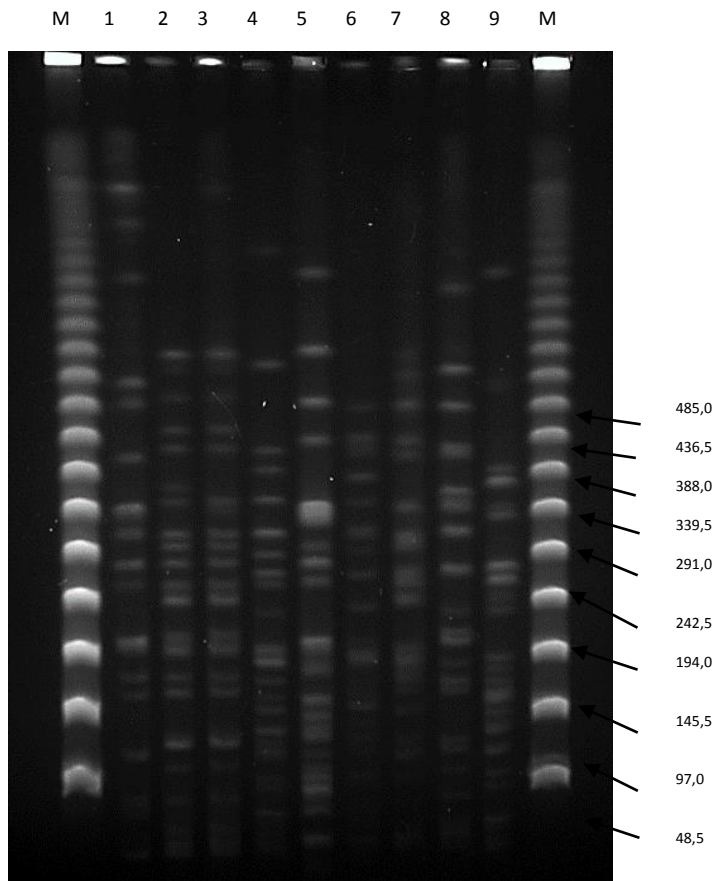


Figura III. 11 - Perfis obtidos por PFGE de *P. aeruginosa*. Linhas M *lambda ladder PFGE marker*. Linhas 1 a 9 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)

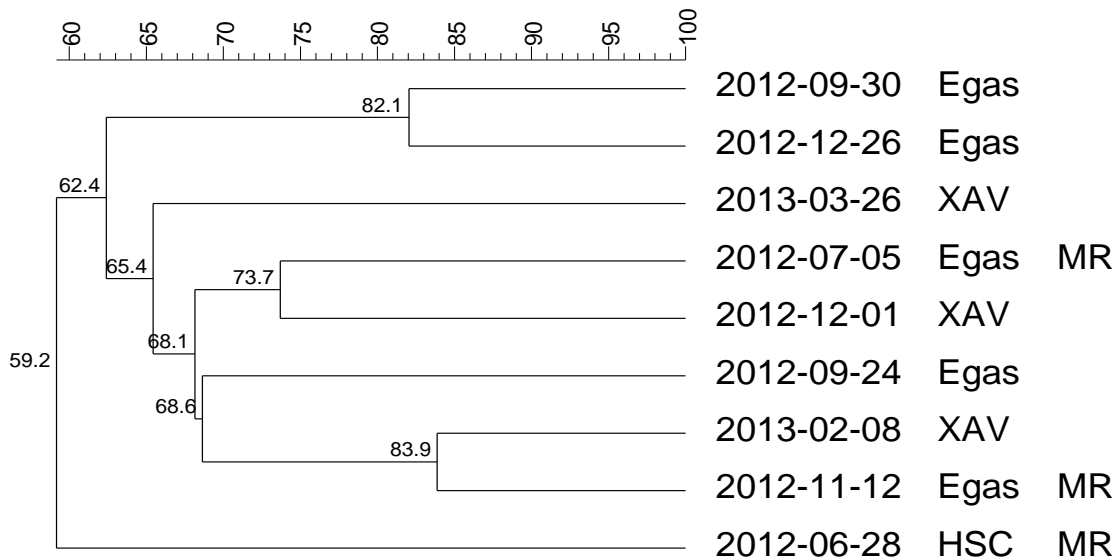


Figura III. 12 - Dendograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 9 estirpes de *P. aeruginosa*. À direita encontram-se os dados relativos à data de colheita, hospital e perfil de resistência. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier; HSC- Hospital Santa Cruz; MR- multirresistente.

III. Resultados

3.2 Eletroforese em campo pulsado para *A. baumannii*

A análise à espécie *A. baumannii* (Figuras III.13 e III.14) revelou a existência de 2 clones distintos (AB1 e AB2). O clone AB2 inclui 7 estirpes e o clone AB1 apresenta 2 estirpes com 100% de semelhança. As estirpes pertencentes ao clone AB1 têm o mesmo local de proveniência (HEM) e as suas datas de colheita coincidem no tempo (Janeiro e Fevereiro de 2013), apresentando uma total correlação espaço-temporal. Quanto às restantes, apenas uma das estirpes é proveniente do HSFX, todas as outras provêm do HEM, com as suas datas de isolamento a variarem entre Julho de 2012 e Março de 2013. Contudo, todas as estirpes apresentam um grau de similaridade muito elevado (87,9%). É substancialmente visível que é a espécie com maior semelhança entre as estirpes em estudo, apresentando fenótipos multirresistentes em todas elas. É de notar que os perfis de suscetibilidade entre os clones são igualmente idênticos.

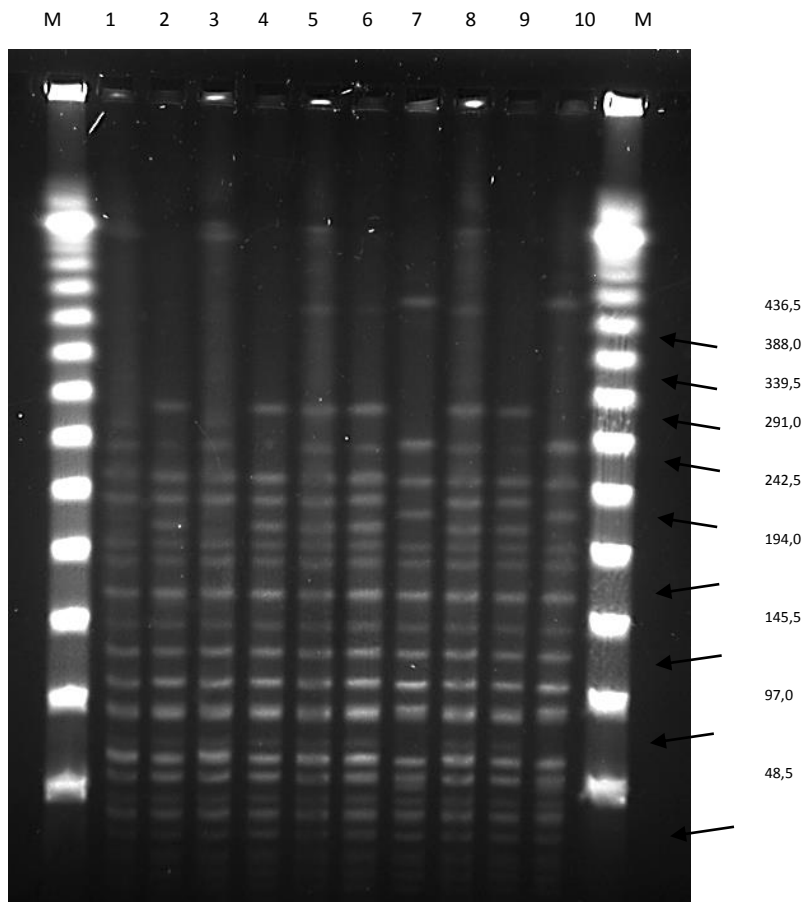


Figura III. 13 - Perfis obtidos por PFGE de *A. baumannii*. Linhas M *lambda ladder PFGE marker*. Linhas 1 a 11 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)

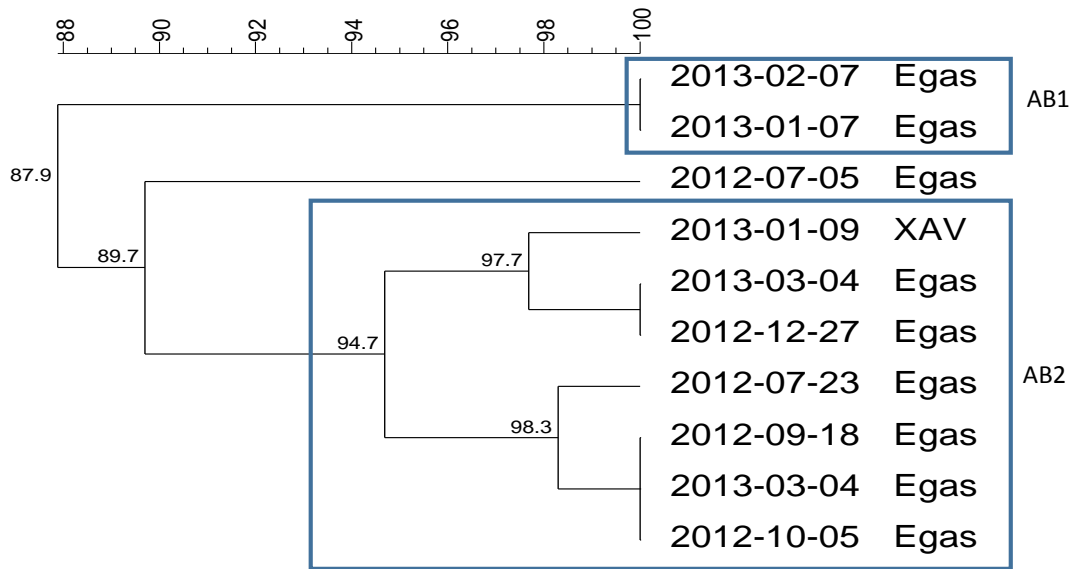


Figura III. 14 - Dendrograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 10 estirpes de *A. baumannii*. Estirpes com proximidade genética superior a 90% foram consideradas do mesmo clone. Ao lado estão os dados relativos à data de colheita e hospital. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier;

3.3 Eletroforese em campo pulsado para *S. aureus*

A análise à espécie *S. aureus* revelou a existência de 3 clones distintos: SA1; SA2; SA3 (Figuras III.15 e III.16) e 6 estirpes (35,3%) que não são clonais e que possuem alguma variabilidade genética. O clone SA1 apresenta três estirpes, o SA2 seis e o SA3 apresenta duas. O clone SA1 e SA3 são constituídos exclusivamente por estirpes meticilina-resistentes, enquanto o clone SA2 inclui também uma estirpe meticilina-suscetível. Os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos são idênticos nos clones SA2 e SA3. No clone SA1 uma das estirpes é resistente às quinolonas e à meticilina enquanto a outra é suscetível a ambas. Todos estes clones são constituídos por estirpes provenientes do HEM e do HSFX isolados entre 09/2012 e 07/2013, não apresentando uma relação espaço-temporal significativa.

III. Resultados

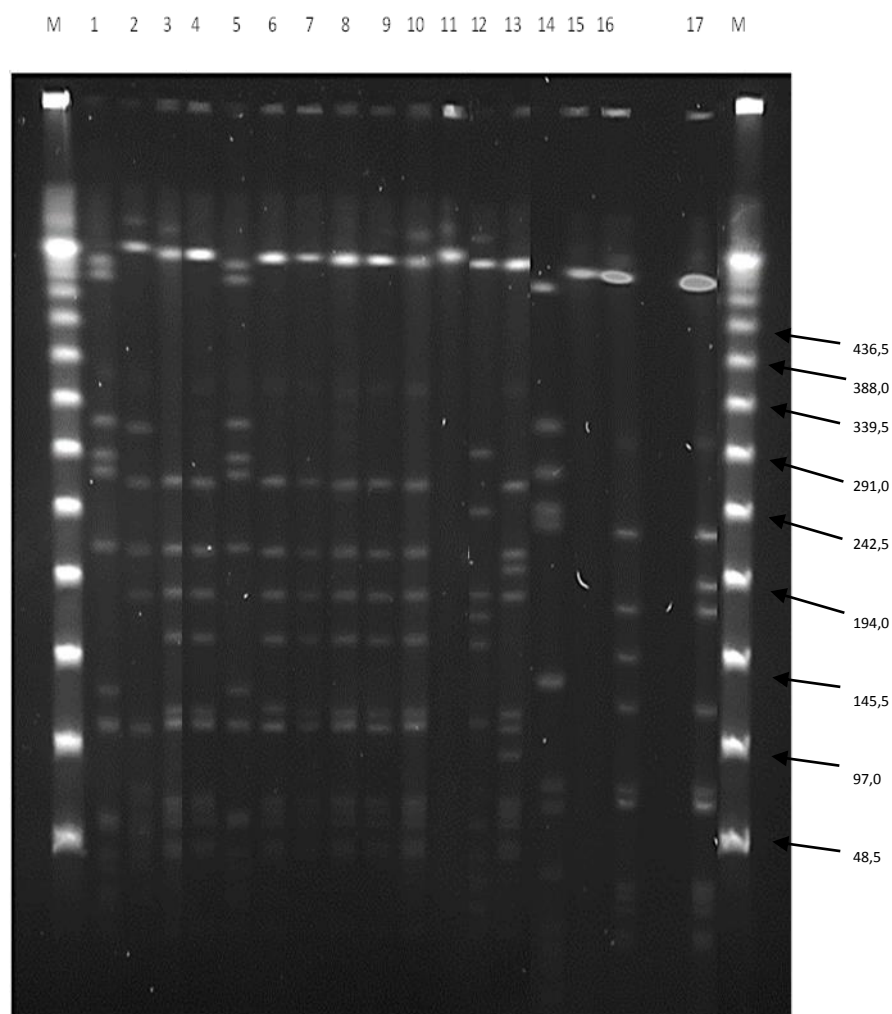


Figura III. 15 - Perfis obtidos por PFGE de *S. aureus*. Linhas M lambda ladder PFGE marker. Linhas 1 a 17 estirpes em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)

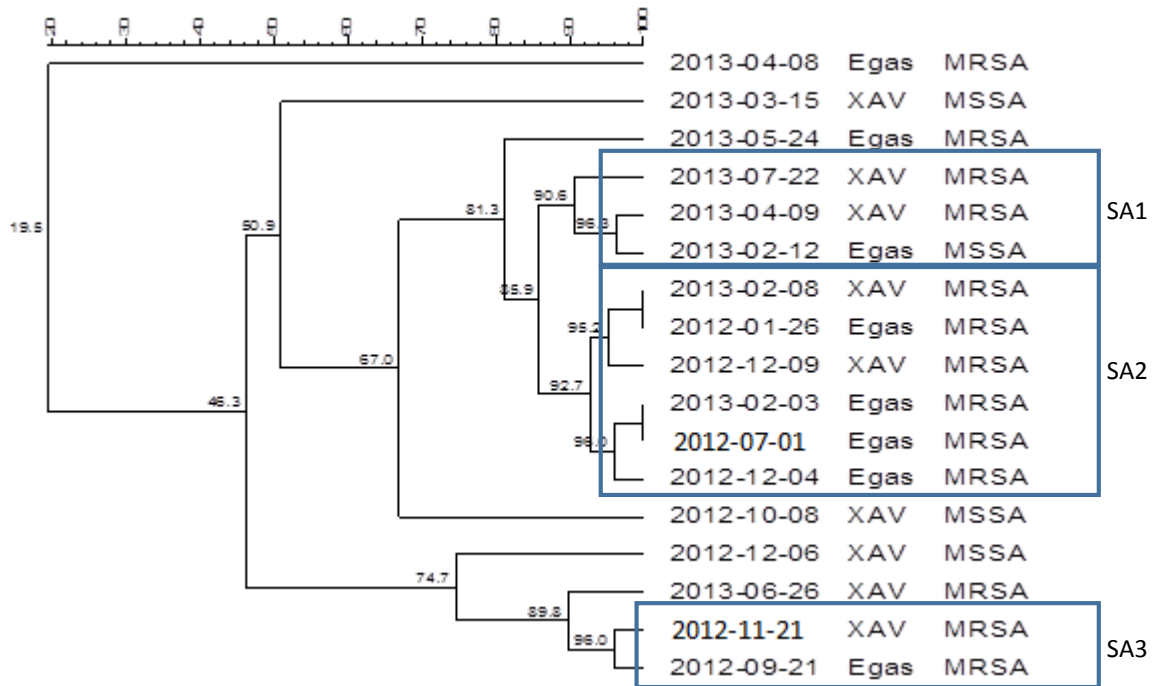


Figura III. 16 - Dendrograma resultante da análise UPGMA dos perfis de PFGE obtidos para as 17 estirpes de *S. aureus*. Estirpes com proximidade genética superior a 90% foram consideradas do mesmo clone. Ao lado estão os dados relativos à data de colheita, hospital e perfil de resistência. Egas- Hospital Egas Moniz; XAV- Hospital São Francisco de Xavier; MR- multirresistente.

4. Teste para determinar a atividade lítica dos bacteriófagos

4.1 Teste de infecção por spot

Na avaliação da atividade fágica contra as diferentes estirpes do estudo, em teste por *spot* (Figura III.17) os bacteriófagos de *S. aureus*, F44/10 e F125/10, infetaram 17 estirpes sendo 100% eficazes. Por sua vez, os bacteriófagos de *P. aeruginosa* F770/05 e F510/08 de 9 estirpes infetaram 5 e 4 estirpes respectivamente, sendo eficazes mas com percentagens inferiores aos fagos de *S. aureus*, apresentado ainda assim valores relevantes, com uma percentagem de infecção de 50% ± 5,5. Por último, o bacteriófago de *A. baumannii* (F1245/05) revelou pouca eficácia, com uma percentagem de infecção de apenas 27,27%.

III. Resultados



Figura III. 17 - Resultado do teste de infecção por *spot*. Placas líticas dos bacteriófagos de *S. aureus*.

Após a verificação dos halos de lise nas diferentes estirpes infetadas pelos bacteriófagos procedeu-se à quantificação dos diferentes fagos para se calcular o respetivo título. Para tal foi necessário o conhecimento prévio do título de cada bacteriófago, o qual é obtido pela infecção do mesmo na sua estirpe de propagação. Na tabela III.4 apresenta-se o título de cada fago.

Tabela III. 4 - Títulos (*pfu plaque forming units*) dos diferentes bacteriófagos

Espécie	Bacteriófagos	Título (<i>pfu/mL</i>)
<i>P. aeruginosa</i>	F770/05	$7,2 \cdot 10^{10}$
	F510/08	$3,9 \cdot 10^{10}$
<i>A. baumannii</i>	F1245/05	$2,9 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i>	F44/10	$5,3 \cdot 10^{10}$
	F125/10	$1,35 \cdot 10^9$

4.2 Teste de quantificação dos bacteriófagos

Este teste consistiu em, numa fase inicial, fazer-se uma análise quantitativa do número de placas fágicas formadas pela destruição das células hospedeiras das estirpes em estudo. Com base no conhecimento prévio do título de cada bacteriófago (Tabela III.4) efetuaram-se várias diluições seriadas do mesmo (Figura III.18). Quando se procedeu à contagem de halos de lise em cada diluição apenas se validaram para a quantificação dos bacteriófagos placas que tenham entre 30 a 300 placas fágicas formadas (*pfu*).

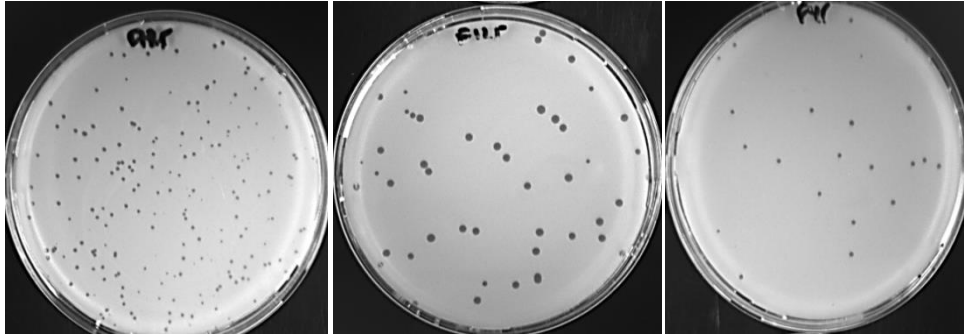


Figura III. 18 - Resultado de uma infecção por placa. Diluições seriadas do bacteriófago F125/10 de *S. aureus*.

4.2.1. *P. aeruginosa*

Nas 9 estirpes testadas os bacteriófagos de *P. aeruginosa* F770/05 e F510/08 tiveram uma percentagem de infecção de 13,64% ± 4,54 (Figura III.19). O F770/05 infetou duas estirpes e na estirpe 8 o título foi superior ao título obtido na estirpe de propagação ($7,2 \cdot 10^{10}$) enquanto o F510/08 infetou apenas uma estirpe.

Fagos	Estirpes	
	F770/05	F510/08
	0	0
	0	0
	$9,2 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$
	$1,05 \cdot 10^{11}$	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0

Figura III. 19 - Mapa com as estirpes infetadas pelos fagos F44/10 e F125/10 e respetivos títulos. Vermelho- sem infecção; Verde-claro- infecção com título inferior ao da estirpe de propagação; Verde-escuro- Título igual ou superior ao da estirpe de propagação

4.2.2. *A. baumannii*

Quanto ao bacteriófago F1245/05 de *A. baumannii* os resultados revelaram que este bacteriófago não tem nenhuma atividade contra estas estirpes multirresistentes de *A. baumannii*. Estes resultados confirmaram os resultados que já tinham sido sugeridos pelo teste por spot.

4.2.3. *S. aureus*

Neste teste os bacteriófagos de *S. aureus* revelaram uma elevada eficácia confirmando os resultados obtidos no teste por spot, contra as estirpes em estudo sendo que o F125/10 foi mais eficaz com

III. Resultados

94,12% de infecção, infetando 16 estirpes das 17 estudadas, enquanto o F44/10 infetou 12 estirpes (69,20%). Na figura III.20 estão representados os diferentes títulos obtidos a partir da infecção dos bacteriófagos nas estirpes em estudo de *S. aureus*. O bacteriófago F125/10 para além de infetar mais estirpes teve quase sempre o mesmo título obtido na sua estirpe de propagação. Este resultado revela uma elevada eficácia contra estirpes clínicas de PAV.

Fagos	Estirpes		
	F44/10	F125/10	
	5,4*10 ¹⁰	3,7*10 ⁹	10
	0	5,3*10 ⁸	12
	1,10*10 ¹⁰	2,87*10 ⁹	13
	6,1*10 ¹⁰	3,5*10 ⁹	17
	0	4,5*10 ⁹	18
	5,1*10 ¹⁰	3,6*10 ⁹	19
	0	1,76*10 ⁹	22
	4,4*10 ⁹	3,6*10 ⁹	25
	8,4*10 ⁹	2,45*10 ⁹	26
	5,7*10 ⁹	3,10*10 ⁹	27
	0	0	29
	9,4*10 ¹⁰	3,9*10 ⁹	34
	3,5*10 ¹⁰	1,31*10 ⁹	35
	6,1*10 ¹⁰	3,3*10 ⁹	36
	0	1,98*10 ⁹	37
	1,2*10 ¹⁰	1,9*10 ⁹	38
	5,2*10 ⁹	4,81*10 ⁹	39

Figura III. 20 - Mapa com as estirpes infetadas pelos fagos F44/10 e F125/10 e respetivos títulos. Vermelho- sem infecção; Verde-claro- infecção com título inferior ao da estirpe de propagação; Verde-escuro- Título igual ou superior ao da estirpe de propagação.

IV. Discussão

A pneumonia nosocomial é a infeção hospitalar mais prevalente em Portugal, ocorrendo principalmente em UCI. É uma infeção grave com elevadas taxas de mortalidade (20 a 30%) custos elevados e com uma elevada propensão para o aumento de resistências devido à elevada prescrição de antibióticos. Tornou-se então premente a criação de medidas de prevenção e terapêuticas alternativas às já existentes.

Durante o estudo foram isolados 103 agentes etiológicos (19 espécies distintas) causadores de PAV no serviço do CHLO. Das diferentes espécies isoladas *S. aureus* foi a mais prevalente com 27,2%, *P. aeruginosa* a segunda mais prevalente com 15,5% e *A. baumannii* a terceira mais prevalente 11,7%. Estes resultados revelam que as espécies em estudo foram adequadas por serem as principais espécies causadoras da PAV. Os resultados deste estudo vão de encontro com outros estudos realizados, que reportam como microrganismos mais prevalentes as espécies de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Park, 2005 ; Giantsou *et al.*, 2005; Hunter, 2006).

Neste estudo foram possíveis incluir das três espécies 36 estirpes, verificando-se uma prevalência de *S. aureus* (n=17), em relação a *A. baumannii* (n=10) e *P. aeruginosa* (n=9). É de referir igualmente que dos doentes em estudo apenas 4 (12,5%) apresentavam infeção polimicrobiana, resultados que diferem de outros estudos (Joseph *et al.*, 2010). Desses 4 doentes todos estavam infetados com a espécie de *A. baumannii*, este facto evidencia que esta bactéria é essencialmente oportunista.

Neste estudo verificou-se também que as percentagens de PAV de classificação de início precoce ou de início tardio variaram entre 41-59%. Sendo que dos 32 doentes 19 (59%) desenvolveram PAV tardiamente enquanto 13 (41%) desenvolveram PAV precocemente. Estes resultados revelam percentagens semelhantes com o estudo de Joseph N. *et al* (Joseph *et al.*, 2010) mas difere do estudo realizado por Vallés J. *et al* (Vallés *et al.*, 2007) que apresenta uma elevada prevalência (72,5%) de doentes com PAV de início tardio. Foi também possível verificar que as espécies de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram mais associadas à PAV de início tardio (66,7% e 80% respetivamente) enquanto a espécie de *S. aureus* apresentou percentagens equivalentes nos dois casos (47% início precoce e 53% início tardio). Estes resultados são equivalentes a outros estudos como o de Park D.(Park, 2005) que associa estas espécies maioritariamente a PAV de início tardio. Os resultados alcançados eram os esperados pois as espécies de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são bactérias oportunistas, logo seria de esperar que tivessem um aparecimento tardio infetando doentes imunocomprometidos, enquanto a espécie de *S. aureus* que faz parte de 25% da flora normal e causa infeções em imunocompetentes, seria de esperar que a sua prevalência não diferisse muito entre PAV de início precoce ou tardio. Contudo, é possível também que se possa associar a elevada taxa de PAV de início precoce ao facto da maioria dos doentes ter elevados tempos de internamento, serem mais idosos (e por isso mais imunocomprometidos) e terem sido sujeitos a uma forte pressão antibiótica administrada previamente (Chastre e Fagon, 2002).

IV. Discussão

Foi então importante no estudo saber se estas estirpes causadoras de PAV seriam estirpes únicas ou pertencentes a um grupo clonal, para isso procedeu-se à caracterização das mesmas. A tipagem molecular de isolados bacterianos provenientes de diferentes origens, pode fornecer informação epidemiológica necessária para controlar infecções, bem como permitir averiguar o risco associado à transmissão de espécies bacterianas, neste caso em particular *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus*. A construção dos dendogramas permitiu avaliar a heterogeneidade encontrada entre os diferentes isolados das diferentes espécies.

A população em estudo de *P. aeruginosa* é caracterizada pela sua variabilidade genética. Parte-se assim do princípio que as estirpes provêm de origens distintas, não apresentam grande associação entre elas e encontram-se disseminadas, resultados que vão de encontro com outros estudos efetuados com estirpes clínicas de *P. aeruginosa* (Scott e Pitt, 2004). A população de *S. aureus* apresenta alguma variabilidade genética mas contém três grupos de clones, desses clones dois encontram-se relacionados entre si (85,9%) e um dos clones não demonstra uma relação direta ou associação com os outros dois (46,3%). Por último, na análise à população de *A. baumannii* verificou-se a presença de estirpes muito idênticas em que entre as 10 estirpes existe uma percentagem de similaridade de 87,9%. A análise revelou a existência de dois clones em que um deles apresentava 7 estirpes. Esta conformidade entre os isolados dentro de um *cluster* genotípico pode ser interpretada de duas maneiras distintas: ou como indicativo de transmissão de uma única estirpe entre os doentes, ou pode refletir a aquisição independente desta estirpe a partir de diversas fontes. É necessário ter em conta também que das 10 estirpes de *A. baumannii* apenas 1 é proveniente do HSFX, as restantes 9 provêm do HEM, sendo isto um forte indício de grande disseminação destas estirpes neste hospital possivelmente por contaminação cruzada na UCI.

Os resultados deste estudo indicam que a grande maioria dos doentes com PAV cujo agente fosse *P. aeruginosa* estavam infetados por estirpes únicas, os doentes com *S. aureus* infetados com estirpes únicas e estirpes do mesmo clone, enquanto a maioria dos doentes com *A. baumannii* estava infetada com estirpes pertencentes ao mesmo clone.

Como se verificou no estudo, uma elevada percentagem de estirpes apresentou-se resistente aos diversos antimicrobianos. Das estirpes de *A. baumannii* 80% eram pan resistentes e 20% eram multirresistentes. Dentro da espécie de *P. aeruginosa* apenas três (33,3%) eram multirresistentes as restantes apresentavam suscetibilidade a alguns antibióticos (aminoglicosídeos, colistina, cefalosporinas, β -lactâmicos e quinolonas), mas todas as estirpes (100%; n=9) apresentaram perfis de suscetibilidade à colistina e aos aminoglicosídeos. Por último, 13 (76,5%) das estirpes de *S. aureus* eram resistentes à meticilina (MRSA) e apenas 4 (23,5%) suscetíveis à meticilina (MSSA). A elevada taxa de resistências entre as estirpes do estudo pode dever-se ao facto dos doentes, previamente tratados, terem sido sujeitos a uma grande pressão antibiótica de largo espectro: aminoglicosídeos, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, glicopéptidos, carbapenemos, penicilinas e mupirocina ou então mesmo a resistências inatas dos microrganismos patogénicos, visto que alguns apresentaram diversas resistências sem terem sido submetidos a qualquer pressão antibiótica. Já foi demonstrado que as terapias empíricas de largo espectro constituem um fator potencial ao

desenvolvimento de estirpes resistentes aos antibióticos (Piskin *et al.*, 2012).

Concluindo, nas estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* que apresentavam fenótipos multirresistentes apenas a colistina (polimixina) se apresentou como antibiótico eficaz, o que é altamente preocupante dado que a colistina é um antibiótico de último recurso. Ou seja, para as 13 estirpes multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* pode-se dizer que praticamente se esgotaram as opções terapêuticas, o que alerta para o grande problema de saúde pública que constituem as infecções nosocomiais por estes bacilos não fermentativos. Quanto à espécie de *S. aureus* encontrou-se no estudo uma taxa elevada de estirpes resistentes à meticilina, 76,5%, fator preocupante e congruente com outros estudos (Suk Lee *et al.*, 2013), ainda assim possui antibióticos eficazes como a vancomicina, a mupirocina, as tetraciclina e o trimetoprim/sulfametoxazol.

Com a disseminação destas estirpes nas UCI, é necessário melhorar o processo de identificação das suas resistências de modo a aplicar uma terapia correta e eficaz. No presente estudo realizaram-se vários testes fenotípicos com o intuito de identificar os tipos de resistências dos diferentes isolados bacterianos. Realizaram-se testes para identificar as seguintes enzimas: ESBL, MBL e AmpC.

O teste fenotípico para as ESBL não foi conclusivo, mesmo utilizando a cloxacilina para inibir as AmpC e também devido à falta de *guidelines* para *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. O número de estirpes produtoras de ESBL são geralmente baixos devido à produção indutiva de enzimas AmpC, que são resistentes à inibição pelo ácido clavulânico, à diminuição da permeabilidade da membrana externa e à hiper regulação dos sistemas de efluxo (Jiang *et al.*, 2006), o que torna estes testes pouco fidedignos e com resultados pouco conclusivos, como se veio a verificar.

Os testes para deteção de MBL demonstraram a existência de 10 (52,6%) possíveis estirpes produtoras de enzimas MBL, sendo que a maioria destas pertencia à espécie de *A. baumannii*, todas resistentes ao imipenem, ao contrário das estirpes de *P. aeruginosa* onde apenas 5 estirpes eram resistentes ao imipenem. Diferentes estudos têm verificado que a resistência aos carbapenemos deve-se principalmente ao aumento de estirpes *P. aeruginosa* produtoras de MBL (Upadhyay, Sem e Bhattacharjee, 2010). As enzimas MBL têm um papel crítico na resistência ao imipenem e reforça a possibilidade destas enzimas se disseminarem entre os isolados nosocomiais. A espécie de *A. baumannii* também apresenta resistência aos carbapenemos e tem sido responsável por diversos surtos (Corbella *et al.*, 2000). Visto no estudo terem sido detetadas estirpes de *A. baumannii* pan resistentes e multirresistentes é possível que estas estirpes sejam produtoras de MBL. Os testes para a deteção de estirpes produtoras de MBL foram o teste modificado de Hodge e o teste de sinergia ao EDTA e apenas se verificaram resultados concordantes entre os testes para as duas estirpes de *P. aeruginosa* que apresentaram resultados positivos em ambos os testes. No teste de sinergia ao EDTA as estirpes de *A. baumannii* não demonstraram resultados positivos. Sendo que o teste de sinergia ao EDTA é mais utilizado para *P. aeruginosa*, é altamente sensível mas pouco específico, podendo conduzir a falsos positivos, tornando-se pouco fiável. Enquanto o teste modificado de Hodge é um indicador baseado em carbapenemases. Não sendo um teste específico de MBL, é um teste

IV. Discussão

fiável para determinar se há possibilidade das estirpes serem produtoras de MBL. É de salientar que, ainda não existem testes fenotípicos padronizados para a detecção de MBL.

Os testes fenotípicos utilizados para a detecção de AmpC, teste do disco AmpC e teste tridimensional, identificaram 10 estirpes como possíveis produtoras de AmpC, todas de *A. baumannii*. Estes testes não são padronizados para a detecção fidedigna de estirpes produtoras de AmpC, são apenas testes confirmatórios da hidrólise de cefamicinas (Thomson, 2010). Atualmente, os documentos do CLSI não apresentam testes recomendados para a detecção de AmpC nesta espécie. Seria então interessante validar os resultados obtidos no presente estudo através de testes genotípicos de modo a confirmar os diferentes resultados dos testes fenotípicos.

Atualmente os laboratórios hospitalares de diagnóstico microbiológico não têm normas de identificação rápida quanto a estes tipos de resistência antibacteriana em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. A gravidade de uma infecção como a PAV requer brevidade na sua terapia e a falta de testes de confirmação para as estirpes produtoras destas enzimas pode ter um papel relevante na emergência de estirpes resistentes, diminuindo conseqüentemente o poder de resposta do sistema de saúde a este tipo de infecções. São necessários mais estudos neste âmbito, de modo a criar normas e métodos fidedignos para a detecção destes mecanismos de resistência nestas espécies causadoras de importantes infecções nosocomiais.

Com vista a aumentar a eficácia das terapêuticas antibacterianas e a diminuir a emergência de resistências entre os isolados bacterianos, outros tipos de terapia têm sido alvo de estudo. Como coadjuvante da terapêutica antibiótica surgem outro tipo de terapias como a terapia fágica. Esta já provou no passado ser eficaz e atualmente está a ser alvo de estudo e de grande interesse por parte da indústria de biotecnologia. Já se encontram bem estabelecidas as vantagens dos bacteriófagos em relação aos antibióticos, tais como: os seus efeitos bactericidas mesmo contra microrganismos multirresistentes devido aos seus mecanismos de ação serem distintos dos mecanismos dos antibióticos, a sua capacidade de proliferação em feridas tornando o alvo mais específico que os antibióticos, a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas, a sua eliminação do hospedeiro quando o microrganismo patogénico não se encontra mais presente, o seu baixo custo de produção e a sua baixa toxicidade.

Todos estes fatores são promissores e condições exigíveis para a continuação do estudo na investigação para tratamento de infecções em humanos. Esta área de terapia fágica encontra-se cada vez mais proeminente através de novos bacteriófagos, novas tecnologias, assim como um melhor entendimento da biologia e ecologia dos mesmos. Realizam-se cada vez mais estudos para comprovar a eficácia dos bacteriófagos contra estirpes de diversas origens: desde estirpes animais (Son *et al.*, 2010), estirpes humanas e estirpes isoladas do ambiente, etc (Knezevic *et al.*, 2009). Têm sido também realizados diversos estudos com estirpes clínicas com o intuito de provar o potencial que os bacteriófagos apresentam contra estirpes hospitalares: infecções estafilocócicas (com aplicações tópicas dos bacteriófagos em pomadas) (O'Flaherty *et al.*, 2005); estudos em estirpes multirresistentes de *A. baumannii* (reduzindo a densidade bacteriana em 30min após a administração do bacteriófago) (Shen *et al.*, 2012); estudos na prevenção e tratamento de infecções pulmonares com

estirpes clínicas de *P. aeruginosa* (Debarbieux *et al.*, 2010). Este tipo de investigação é de grande interesse para o bem-estar e saúde das populações devido à sua eficácia comprovada e deveria ser uma aposta real para entidades reguladoras. Diversas empresas têm desenvolvido produtos de base fágica e alguns já foram aprovados por entidades como a EPA, USDA e a FDA (Lu e Koeris, 2011), na área do controlo microbiológico alimentar. A aposta neste tipo de investigação passaria por desenvolver novas áreas de utilização contra MRSA, VISA e até VRSA que vêm sendo reconhecidos como alvos bem-sucedidos e casos de sucesso desde a descoberta dos bacteriófagos, em 1930 (Kutter *et al.*, 2010).

O uso apropriado de medidas preventivas e de controlo das infeções bacterianas usando os bacteriófagos poderá vir a ter um impacto positivo no prognóstico de doentes com PAV. A administração precoce de uma terapia adequada, baseada em AST e testes de suscetibilidade aos bacteriófagos, poderá conduzir a uma melhoria de resultados clínicos em doentes com PAV. Os bacteriófagos têm sido cada vez mais alvos de estudo como medida preventiva em diversas infeções. Estudos como o de Weiling Fu *et al* (Fu *et al.*, 2009) demonstraram um papel preventivo na formação de biofilmes por *P. aeruginosa* em cateteres previamente tratados com suspensões fágicas.

No presente estudo foi-se então avaliar a atividade de 5 bacteriófagos distintos contra as três espécies estudadas sendo os seus resultados bastante promissores, em particular nas estirpes *S. aureus*. Os bacteriófagos de *S. aureus* avaliados (F44/10 e F125/10) revelaram uma ótima ação bactericida contra estirpes hospitalares de infeções respiratórias do trato inferior, neste caso em particular na PAV. Estes bacteriófagos foram utilizados previamente num modelo de infeção de úlcera crónica e já tinham mostrado a sua eficácia (Mendes *et al.*, 2013). Agora quando testados em estirpes de infeções respiratórias muito graves e com um elevado impacto na saúde pública como a PAV foram outra vez identificados como um possível agente antibacteriano. O *host range* dos bacteriófagos F125/10 e F44/10 foi analisado num conjunto de estirpes clínicas humanas de *S. aureus*, no qual a prevalência de MRSA foi de 76,5%. Verificou-se uma alta percentagem de infeção (94,1%; n=17) do bacteriófago F125/10 nas estirpes de *S. aureus* inclusive MRSA. Todas as estirpes MRSA foram infetadas por este bacteriófago e apenas uma estirpe MSSA não foi infetada. Quanto ao fago F44/10 as percentagens de infeção diminuíram para 70,6% o que revela uma forte atividade também, infetando 12 estirpes. Os bacteriófagos de *S. aureus* foram os mais eficazes contra as estirpes do estudo, mas tendo em conta que dos doentes com PAV (n=32) 17 (53,1%), ou seja mais de metade, encontrava-se infetado por *S. aureus* podemos concluir que a maioria dos doentes apresentaria uma resposta positiva ao tratamento com estes fagos.

Os bacteriófagos de *P. aeruginosa* (F770/05 e 510/08) apresentaram taxas de infeção mais baixas (22,2% e 11,1%) mas ainda assim relevantes, dado que demonstraram eficácia em 3 estirpes e com a facilidade que existe na procura de novos bacteriófagos seria possível administrar estes às espécies suscetíveis e administrar outros às restantes estirpes. Os resultados aqui demonstrados vêm confirmar a literatura descrita, revelando que a terapia fágica pode vir a ser um forte complemento à terapia antibiótica nos doentes com diversas infeções e também em doentes com PAV. O bacteriófago de *A. baumannii* (F1245/05) não demonstrou qualquer eficácia contra as estirpes

IV. Discussão

de *A. baumannii* (0% de infecção). A emergência de estirpes multirresistente de *A. baumannii* é um tema de grande relevância, existindo uma necessidade de colmatar as falhas da antibioterapia contra estas estirpes. Diversos estudos de isolamento e caracterização de bacteriófagos contra estirpes multirresistentes de *A. baumannii* têm sido realizados (Yang *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2012), devido ao aumento de resistência deste microrganismo pelo mundo (Popova *et al.*, 2012). Alguns estudos revelam bacteriófagos com uma boa atividade lítica, é necessário no entanto prosseguir para investigações *in vitro* e *in vivo* em isolados multirresistentes clínicos (Jin *et al.*, 2012).

Em suma, os resultados apresentados nesta tese demonstraram que os estudos epidemiológicos são cruciais, avaliando o desempenho das diferentes instituições de saúde, como ferramenta útil para prevenir infecções nosocomiais e para assegurar a segurança do doente. No presente estudo, as diferentes estirpes eram maioritariamente multirresistentes, provocada pela pressão antibiótica a que foram submetidas. A grande maioria dos doentes esteve internada durante um longo período, durante o qual foram sujeitos a várias classes de antibióticos, o que conduziu a uma elevada percentagem de resistências aos antimicrobianos. Assim torna-se imprescindível a implementação de outro tipo de terapia que acompanhe e potencie a antibioterapia. Os bacteriófagos apresentam um grande potencial como terapia bactericida contra infecções pulmonares. Já foram demonstrados os seus efeitos positivos tanto no estudo de Carmody L. *et al.* (Carmody *et al.*, 2010) que demonstrou uma densidade bacteriana reduzida nos pulmões 48h após o tratamento com um fago, como no estudo de Debarbieux L. *et al.* (Debarbieux *et al.*, 2010) que sugeriu que a rápida eficácia dos bacteriófagos na destruição de bactérias nos pulmões seria por não existirem proteínas que inibissem a ação dos mesmos.

Contudo é necessário mais investigação nesta área de modo a comprovar a eficácia da terapia fágica em infecções em humanos para que estes futuramente se possam utilizar na terapia de infecções como a PAV. Este estudo espera contribuir para investigações futuras, sobre a utilização de bacteriófagos como tratamento de doenças infecciosas, servindo como base de análises e fornecendo algumas reflexões sobre este assunto.

V. Bibliografia

- Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, and Elizabeth Martin Kutter. 2011. Phage Treatment of Human Infections. *Bacteriophage* 1(2): 66–85.
- Ackermann, H.-W. 2003. Bacteriophage Observations and Evolution. *Research in Microbiology* 154(4): 245–251.
- Adair, C. G., S. P. Gorman, B. M. Feron, et al. 1999. Implications of Endotracheal Tube Biofilm for Ventilator-associated Pneumonia. *Intensive Care Medicine* 25(10): 1072–1076.
- American Thoracic Society and Infectious Diseases Society. 2005. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171(4): 388–416.
- Barbas III, Carlos F., Dennis R. Burton, Jamie K. Scott, and Gregg J. Silverman. 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bartlett, John G., Scott F. Dowell, Lionel A. Mandell, et al. 2000. Practice Guidelines for the Management of Community-acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases* 31(2): 347–382.
- Bio-Rad. CHEF Solutions, Applications & Technologies. 2000. <http://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/chef-solutions> in Life Science Research, <http://www.bio-rad.com>
- Biswas, B. 2002. Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity* 70(1): 204–210.
- Bonomo, Robert A., and Dora Szabo. 2006. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 43(Supplement 2): S49–S56.
- Boyd, E. Fidelma, Brigid M. Davis, and Bianca Hochhut. 2001. Bacteriophage–bacteriophage Interactions in the Evolution of Pathogenic Bacteria. *Trends in Microbiology* 9(3): 137–144.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4): 933–951.
- Brekke, Ole Henrik, and Inger Sandlie. 2003. Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(1): 52–62.
- Bruttin, A., and H. Brussow. 2005. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(7): 2874–2878.
- Burmeister, Margit, and Levy Ulanovsky. 1992. *Methods in Molecular Biology*, vol.12. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols, Methods, and Theories. Humana Press.
- Campbell, Allan. 2003. The Future of Bacteriophage Biology. *Nature Reviews Genetics* 4(6): 471–477.
- Carmody, Lisa A., Jason J. Gill, Elizabeth J. Summer, et al. 2010. Efficacy of Bacteriophage Therapy in a Model of *Burkholderia cenocepacia* Pulmonary Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 201(2): 264–271.

V. Bibliografia

- Cawley, Michael J. 2007. Mechanical Ventilation: a Tutorial for Pharmacists. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 27(2): 250–266.
- Centers for Disease Control and Prevention 2012a. Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) Event. October 22, 2012. <http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/6pscVAPcurrent.pdf> in Ventilator-associated pneumonia, <http://www.cdc.gov>
- Centers for Disease Control and Prevention 2012b. Pulse Net. August 1, 2013 <http://www.cdc.gov/pulsenet/about/index.html> in Pulse Net, <http://www.cdc.gov>
- Centers for Disease Control and Prevention 2012c Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) August 1, 2013 <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html> in MLVA, <http://www.cdc.gov>
- Chan, Benjamin K., and Stephen T. Abedon. 2012. Phage Therapy Pharmacology. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier.
- Chastre, Jean, and Jean-Yves Fagon. 2002. Ventilator-associated Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165(7): 867–903.
- Choi, Jeongdong, Shireen Meher Kotay, and Ramesh Goel. 2011. Bacteriophage-based Biocontrol of Biological Sludge Bulking in Wastewater. *Bioengineered Bugs* 2(4): 214–217.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22, January.
- Corbella, Xavier, Abelardo Montero, Miquel Pujol, et al. 2000. Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance During a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11): 4086–4095.
- Coudron, Philip E., Ellen S. Moland, and Kenneth S. Thomson. 2000. Occurrence and Detection of AmpC Beta-lactamases Among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology* 38(5): 1791–1796.
- Da Silva, G. J. 2004. Long-term Dissemination of an OXA-40 Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* Clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(1): 255–258.
- De Champs, C., L. Poirel, R. Bonnet, et al. 2002. Prospective Survey of β -Lactamases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in a French Hospital in 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(9): 3031–3034.
- Debarbieux, Laurent, Dominique Leduc, Damien Maura, et al. 2010. Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201(7): 1096–1104.
- Department of health and human services, and Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Guidelines for Preventing Health Care–Associated Pneumonia, 2003. Morbidity and Mortality Weekly Report, March 26: 1–36.
- Deplano, A., O. Denis, L. Poirel, et al. 2005. Molecular Characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(3): 1198–1204

- Di Popolo, A., M. Giannouli, M. Triassi, S. Brisse, and R. Zarrilli. 2011. Molecular Epidemiological Investigation of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Four Mediterranean Countries with a Multilocus Sequence Typing Scheme: Research Note. *Clinical Microbiology and Infection* 17(2): 197–201.
- Durmaz, R., Baris Otlu, Fatih Koksak, et al. 2009. The Optimization of a Rapid Pulsed-field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Infectious Diseases*: 372–377.
- Fischetti, Vincent A. 2008. Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. *Current Opinion in Microbiology* 11(5): 393–400.
- Fishman, Alfred P., Jack A. Elias, Jay A. Fishman, et al. 2008. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*, vol.2. 4th edition. The McGraw-Hill Companies.
- Fishbain, Joel, and Anton Y. Peleg. 2010. Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clinical Infectious Diseases* 51(1): 79–84.
- Foley, Steven L., Anne Y. Chen, Shabbir Simjee, and Marcus J. Zervos. 2011. *Molecular Techniques for the Study of Hospital Acquired Infection*. Wiley-Blackwell.
- Frost, Laura S., Raphael Leplae, Anne O. Summers, and Ariane Toussaint. 2005. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 722–732.
- Fu, W., T. Forster, O. Mayer, et al. 2009. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(1): 397–404.
- Fujitani, Shigeki, and L. Yu Victor. 2006. Quantitative Cultures for Diagnosing Ventilator-associated Pneumonia: a Critique. *Clinical Infectious Diseases* 43(Supplement 2): S106–S113.
- Gardiner, Katheleen, William Laas, and David Patterson. 1986. Fractionation of Large Mammalian DNA Restriction Fragments Using Vertical Pulsed-field Gradient Gel Electrophoresis. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 12(2): 185–195.
- Garnacho-Montero, J., C. Ortiz-Leyba, F. J. Jimenez-Jimenez, et al. 2003. Treatment of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Ventilator-associated Pneumonia (VAP) with Intravenous Colistin: a Comparison with Imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases* 36(9): 1111–1118.
- Giantsou, Elpis, Nikolaos Liratzopoulos, Eleni Efraimidou, et al. 2005. Both Early-onset and Late-onset Ventilator-associated Pneumonia Are Caused Mainly by Potentially Multiresistant Bacteria. *Intensive Care Medicine* 31(11): 1488–1494.
- Giantsou, Elpis, Nikolaos Liratzopoulos, Eleni Efraimidou, et al. 2007. De-escalation Therapy Rates Are Significantly Higher by Bronchoalveolar Lavage Than by Tracheal Aspirate. *Intensive Care Medicine* 33(9): 1533–1540.
- Goodridge, Lawrence, and Stephen T. Abedon. 2003. Bacteriophage Biocontrol and Bioprocessing: Application of Phage Therapy to Industry. *SIM News* 53(6): 254–262.
- Goodridge, Lawrence D., and Bledar Bisha. 2011. Phage-based Biocontrol Strategies to Reduce Foodborne Pathogens in Foods. *Bacteriophage* 1(3): 130–137.

V. Bibliografija

- Gvozdenović, Ljiljana, Jovanka Kolarović, Mirka \vSarkanović-Lukić, Mira Popović, and Svetlana Trivić. 2012. Incidence and Outcome of Ventilator-associated Pneumonia (our Experience). *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16(6): 599–600.
- Haq, Irshad Ul, Waqas Nasir Chaudhry, Maha Nadeem Akhtar, Saadia Andleeb, and Ishtiaq Qadri. 2012. Bacteriophages and Their Implications on Future Biotechnology: a Review. *Virology* 9(9).
- Harper, D.R., and M.C. Enright. 2011. Bacteriophages for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: *Pseudomonas aeruginosa* Phage Therapy. *Journal of Applied Microbiology* 111(1): 1–7.
- Horan, Teresa C., Mary Andrus, and Margaret A. Dudeck. 2008. CDC/NHSN Surveillance Definition of Health Care-associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections in the Acute Care Setting. *American Journal of Infection Control* 36(5): 309–332.
- Hunter, J D. 2006. Ventilator Associated Pneumonia. *Postgraduate Medical Journal* 82(965): 172–178.
- Jiang, X., Z. Zhang, M. Li, et al. 2006. Detection of Extended-Spectrum -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(9): 2990–2995.
- Jin, Jing, Zhen-Jiang Li, Shu-Wei Wang, et al. 2012. Isolation and Characterization of ZZ1, a Novel Lytic Phage That Infects *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *BMC Microbiology* 12(1): 156.
- Johnson, J. K., S. M. Arduino, O. C. Stine, J. A. Johnson, and A. D. Harris. 2007. Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(11): 3707–3712.
- Jones, Ronald N. 2010. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 51(S1): S81–S87.
- Joseph, Noyal Mariya, Sujatha Sistla, Tarun Kumar Dutta, Ashok Shankar Badhe, and Subhash Chandra Parija. 2010. Ventilator-associated Pneumonia: A Review. *European Journal of Internal Medicine* 21(5): 360–368.
- Kaufmann, Mary Elizabeth. 1998. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* Pp. 33–50. Humana Press Inc.
- Kaur, Jaspal. 2013. Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical and Diagnostic* 7(2): 229–233
- Kelly, D., O. McAuliffe, R.P. Ross, and A. Coffey. 2012. Prevention of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Reduction in Established Biofilm Density Using a Combination of Phage K and Modified Derivatives: Prevention of *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Letters in Applied Microbiology* 54(4): 286–291.
- Knezevic, Petar, Rok Kostanjsek, Dragana Obreht, and Olga Petrovic. 2009. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Specific Phages with Broad Activity Spectra. *Current Microbiology* 59(2): 173–180.
- Koenig, S. M., and J. D. Truitt. 2006. Ventilator-Associated Pneumonia: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews* 19(4): 637–657.

- Kropinski, Andrew M., Amanda Mazzocco, Thomas E. Waddell, Erika Lingohr, and Roger P. Johnson. 2009. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In *Bacteriophages* Pp. 69–76.
- Kutter, Elizabeth, Daniel De Vos, Guram Gvasalia, et al. 2010. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11(1): 69–86.
- Kyungwon Lee, Wee Gyo Lee, Young Uh, Gyoung Yim Ha, and Jihyun Cho. 2003. VIM- and IMP-Type Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, July: 869–871.
- Lambert, Marie-Laurence, Mercedes Palomar, Antonella Agodi, et al. 2013. Prevention of Ventilator-associated Pneumonia in Intensive Care Units: An International Online Survey. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2(1): 9.
- Lee, K., Y. Chong, H. B. Shin, et al. 2001. Modified Hodge and EDTA-disk Synergy Tests to Screen Metallo- β -lactamase-producing Strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* Species. *Clinical Microbiology and Infection* 7(2): 88–91.
- Lee, K., Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, and Y. Chong. 2003. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41(10): 4623–4629..
- Liu, C., A. Bayer, S. E. Cosgrove, et al. 2011. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clinical Infectious Diseases* 52(3): e18–e55.
- Loc-Carrillo, Catherine, and Stephen T. Abedon. 2011. Pros and Cons of Phage Therapy. *Bacteriophage* 1(2): 111–114.
- López-Larrea, Carlos. 2012. *Self and Nonself*. 738th edition. Landes Bioscience and Springer.
- Lu, Timothy K, and Michael S Koeris. 2011. The Next Generation of Bacteriophage Therapy. *Current Opinion in Microbiology* 14(5): 524–531.
- M. de la Maza, Luis, Ellena M. Peterson, Marie T. Pezzlo, and Janet T. Shigei. 2007. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Washington, D.C: ASM Press.
- Mahgoub, Siham, Jimi Ahmed, and Aaron E. Glatt. 2002. Completely Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains •. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 23(8): 477–479.
- Majumdar, Suman S., and Alexander A. Padiglione. 2012. Nosocomial Infections in the Intensive Care Unit. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 13(5): 204–208.
- Manchanda, V. 2003. Occurrence and Detection of AmpC Beta-lactamases Among Gram-negative Clinical Isolates Using a Modified Three-dimensional Test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(2): 415–418.
- Mandell, Gerald L., John E. Bennett, and Raphael Dolin. 2010. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, vol.2. 7th edition. Elsevier.
- Marilyn Chung, Hérminia De Lencastre, Peter Matthews, and Alexander Tomasz. 2000. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Comparison of Results Obtained in a Multilaboratory Effort Using Identical Protocols and MRSA Strains. *Microbial Drug Resistance* 6(3): 188–198.

V. Bibliografia

- Melo-Cristino, José, Cristina Resina, Viviana Manuel, Luís Lito, and Mário Ramirez. 2013. First Case of Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* 382: 205.
- Mendes, João J., Clara Leandro, Sofia Corte-Real, et al. 2013. Wound Healing Potential of Topical Bacteriophage Therapy on Diabetic Cutaneous Wounds: Bacteriophage Therapy for Cutaneous Wounds. *Wound Repair and Regeneration* 21(4): 595–603.
- Meyer, Elisabeth, Frank Schwab, and Petra Gastmeier. 2010. Nosocomial Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia-epidemiology and Trends Based on Data of a Network of 586 German ICUs (2005-2009). *European Journal of Medical Research* 15(12): 514.
- Moran, Gregory J., Richard E. Rothman, and Gregory A. Volturo. 2013. Emergency Management of Community-acquired Bacterial Pneumonia: What Is New Since the 2007 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Guidelines. *The American Journal of Emergency Medicine* 31(3): 602–612.
- Morello, Eric, Emilie Sausseureau, Damien Maura, et al. 2011. Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains: First Steps Towards Treatment and Prevention. Ramy Aziz, ed. *PLoS ONE* 6(2): e16963.
- Murray, Patrick R., Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, and Robert H. Tenover. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, vol.1. 8th edition. ASM Press.
- National Standard Method. 2009. Investigation of Bronchoalveolar Lavage, Sputum and Associated Specimens. In http://www.hpa.org.uk/srmd/div_esl_su/pdf_bacteriology.htm.
- Niederman, Michael S. 2010. Hospital-Acquired Pneumonia, Health Care–Associated Pneumonia, Ventilator-Associated Pneumonia, and Ventilator-Associated Tracheobronchitis: Definitions and Challenges in Trial Design. *Clinical Infectious Diseases* 51(S1): S12–S17.
- O’Flaherty, S., R. P. Ross, W. Meaney, et al. 2005. Potential of the Polyvalent Anti-*Staphylococcus* Bacteriophage K for Control of Antibiotic-Resistant Staphylococci from Hospitals. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1836–1842.
- Olaechea, P.M., J. Insausti, A. Blanco, and P. Luque. 2010. Epidemiología e Impacto de Las Infecciones Nosocomiales. *Medicina Intensiva* 34(4): 256–267.
- Oliveira, Ana, Rui Sereno, and Joana Azeredo. 2010. In Vivo Efficiency Evaluation of a Phage Cocktail in Controlling Severe Colibacillosis in Confined Conditions and Experimental Poultry Houses. *Veterinary Microbiology* 146(3-4): 303–308.
- Park, David R. 2005a. The Microbiology of Ventilator-associated Pneumonia. *Respiratory Care* 50(6): 742–765.
- Park, David R. 2005b. Antimicrobial Treatment of Ventilator-associated Pneumonia. *Respiratory Care* 50(7): 932–955.
- Persing, David H., Fred C. Tenover, James Versalovic, et al. 2004. *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press.
- Petty, Nicola K., Terry J. Evans, Peter C. Fineran, and George P.C. Salmond. 2007. Biotechnological Exploitation of Bacteriophage Research. *Trends in Biotechnology* 25(1): 7–15.

- Pina, Elaine, Goreti Silva, and Etelvina Ferreira. 2010. Relatório Inquérito de Prevalência de Infecção 2010 Programa Nacional de Prevenção e Controlo Da Infecção Associada Aos Cuidados de Saúde. Direcção Geral de Saúde - Ministério da Saúde.
- Pina, Elaine, José A. Paiva, Paulo Nogueira, and Maria Goreti Silva. 2013. Prevalência de Infecção Adquirida No Hospital e Do Uso de Antimicrobianos Nos Hospitais Portugueses. Inquérito. Direcção Geral de Saúde - Ministério da Saúde.
- Pirnay, Jean-Paul, Daniel Vos, Gilbert Verbeken, et al. 2010. The Phage Therapy Paradigm: Prêt-à-Porter or Sur-mesure? *Pharmaceutical Research* 28(4): 934–937.
- Piskin, Nihal, Hande Aydemir, Nefise Oztoprak, et al. 2012. Inadequate Treatment of Ventilator-associated and Hospital-acquired Pneumonia: Risk Factors and Impact on Outcomes. *BMC Infectious Diseases* 12(1): 268.
- Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann. 2003. Outbreak of Extended-Spectrum -Lactamase VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8): 3542–3547.
- Popova, Anastasia V., Evgeny L. Zhilenkov, Vera P. Myakinina, Valentina M. Krasilnikova, and Nikolay V. Volozhantsev. 2012. Isolation and Characterization of Wide Host Range Lytic Bacteriophage AP22 Infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters* 332(1): 40–46.
- Pourzand, Charareh, and Peter Cerutti. 1993. Genotypic Mutation Analysis by RFLP/PCR. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 288(1): 113–121.
- Prevost, G., B. Jaulhac, and Y. Piemont. 1992. DNA Fingerprinting by Pulsed-field Gel Electrophoresis Is More Effective Than Ribotyping in Distinguishing Among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 30(4): 967–973.
- R. Murray, Patrick, Michael A. Pfaller, and Ken S. Rosenthal. 2012. *Medical Microbiology*. 8th edition.
- Rea-Neto, Alvaro, N. C. Youssef, Fabio Tuche, et al. 2008. Diagnosis of Ventilator-associated Pneumonia: a Systematic Review of the Literature. *Crit Care* 12(2): R56.
- Rello, J., A. Torres, M. Ricart, et al. 1994. Ventilator-associated Pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of Methicillin-resistant and Methicillin-sensitive Episodes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150(6): 1545–1549.
- Restrepo, Marcos I., Janet Peterson, Juan F. Fernandez, et al. 2013. Comparison of the Bacterial Etiology of Early-Onset Ventilator Associated Pneumonia and Late-Onset Ventilator Associated Pneumonia in Subjects Enrolled in 2 Large Clinical Studies. *Respiratory Care*.
- Riley, Lee W. 2004. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases Principles and Practices*. ASM Press.
- Sadikot, Ruxana T., Timothy S. Blackwell, John W. Christman, and Alice S. Prince. 2005. Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171(11): 1209–1223.
- Safdar, Nasia, Christopher J. Crnich, and Dennis G. Maki. 2005. The Pathogenesis of Ventilator-associated Pneumonia: Its Relevance to Developing Effective Strategies for Prevention. *Respiratory Care* 50(6): 725–741.

V. Bibliografia

- Sarikaya, Mehmet, Candan Tamerler, Alex K.-Y. Jen, Klaus Schulten, and Francois Baneyx. 2003. Molecular Biomimetics: Nanotechnology through Biology. *Nature Materials* 2(9): 577–585.
- Schouls, Leo M., Emile C. Spalburg, Martijn van Luit, et al. 2009. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. Adam J. Ratner, ed. *PLoS ONE* 4(4): e5082.
- Scott, FW, and TL Pitt. 2004. Identification and Characterization of Transmissible *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Cystic Fibrosis Patients in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, July: 609–15.
- Serwer, Philip, and Frederick J. Dunn. 1990. Rotating Gels: Why, How, and What. *Methods* 1(2): 143–150.
- Shahid, M. 2004. Phenotypic Detection of Extended-spectrum and AmpC -lactamases by a New Spot-inoculation Method and Modified Three-dimensional Extract Test: Comparison with the Conventional Three-dimensional Extract Test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(3): 684–687.
- Shen, Gwan-Han, Jiun-Ling Wang, Fu-Shyan Wen, et al. 2012. Isolation and Characterization of Φ km18p, a Novel Lytic Phage with Therapeutic Potential Against Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Brad Spellberg, ed. *PLoS ONE* 7(10): e46537.
- Son, Jee Soo, Eun Bae Kim, Se Jung Lee, Soo Youn Jun, and Seong Jun Yoon. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* Derived from Bovine Mastitis and Isolation of Two Lytic Bacteriophages. *Journal of General and Applied Microbiology*: 347–353.
- Stein, Andreas, and Didier Raoult. 2002. Colistin: An Antimicrobial for the 21st Century? *Clinical Infectious Diseases* 35(7): 901–902.
- Stewart, Philip S., and J. William Costerton. 2001. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *The Lancet* 358(9276): 135-138
- Suk Lee, Mi, Vanessa Walker, Luke F. Chen, Daniel J. Sexton, and Deverick J. Anderson. 2013. The Epidemiology of Ventilator-Associated Pneumonia in a Network of Community Hospitals: A Prospective Multicenter Study. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 34(7): 657–662.
- Sulakvelidze, Alexander. 2011. The Challenges of Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3): 649–659.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, and J. G. Morris. 2001. Bacteriophage Therapy. *European Industrial Pharmacy* 10: 14-18
- Sutherland, Ian W, Kevin A Hughes, Lucy C Skillman, and Karen Tait. 2004. The Interaction of Phage and Biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 232(1): 1–6.
- Syrmis, M. W. 2004. Rapid Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Harboured by Adult and Paediatric Patients with Cystic Fibrosis Using Repetitive-element-based PCR Assays. *Journal of Medical Microbiology* 53(11): 1089–1096.
- Thawal, Nikhil D., Ajinkya B. Yele, Praveen K. Sahu, and Balu A. Chopade. 2012. Effect of a Novel Podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* Biofilm. *Current Microbiology* 65(1): 66–72.
- Thomson, K. S. 2010. Extended-Spectrum- -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *Journal of Clinical Microbiology* 48(4): 1019–1025.

- Tiwari, Hare K., and Maley R. Sen. 2006. Emergence of Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a Tertiary Care Hospital from Northern Part of India. *BMC Infectious Diseases* 6(1): 156
- Upadhyay, Supriya, Malay Ranjan Sen, and Amitabha Bhattacharjee. 2010. Presence of Different Beta-lactamase Classes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Expressing AmpC Beta-lactamase Enzyme. *The Journal of Infection in Developing Countries* 4(04): 239–242.
- Vallés, J., A. Pobo, O. García-Esquirol, et al. 2007. Excess ICU Mortality Attributable to Ventilator-associated Pneumonia: The Role of Early Vs Late Onset. *Intensive Care Medicine* 33(8): 1363–1368..
- Van Nieuwenhoven, Christianne A., Christine Vandenbroucke-Grauls, Frank H. van Tiel, et al. 2006. Feasibility and Effects of the Semirecumbent Position to Prevent Ventilator-associated Pneumonia: A Randomized Study*: *Critical Care Medicine* 34(2): 396–402.
- Vincent, Jean-Louis, Dalton de Souza Barros, and Silvia Cianferoni. 2010. Diagnosis, Management and Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia An Update. *Drugs*: 1927–1944.
- Walsh, T. R. 2005. The Emergence and Implications of Metallo- β -lactamases in Gram-negative Bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 11(s6): 2–9.
- Wright, A., C. H. Hawkins, E. E. Anggaard, and D. R. Harper. 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic Bacteriophage Preparation in Chronic Otitis Due to Antibiotic-resistance *Pseudomonas aeruginosa*; a Preliminary Report of Efficacy. *Clinical Otolaryngology* 34(4): 349-357
- Wright, Gerard D. 2010. Q&A: Antibiotic Resistance: Where Does It Come from and What Can We Do About It? *BMC Biology* 8(1): 123.
- Yang, Hongjiang, Li Liang, Shuxiang Lin, and Shiru Jia. 2010. Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology* 10(1): 131.
- Ysenberg, HD. 2004. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2o edition. Washington DC: ASM Press.