



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PERFIL MICROBIOLÓGICO E RESISTÊNCIA BACTERIANA DAS
HEMOCULTURAS DA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS DA UNIDADE
LOCAL DE SAÚDE DO ALTO-MINHO

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

por

Ana Catarina Lima Garcez

sob orientação de

Dr. José António Mota Freitas – Director do Departamento de Patologia Clínica da
Unidade Local de Saúde do Alto-Minho

Professora Doutora Maria Manuela Estevez Pintado – Investigadora da Escola Superior de
Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Setembro 2012

RESUMO

O sangue é um líquido estéril que na presença de microrganismos pode iniciar um processo de bacteriemia. A detecção do agente patogénico realiza-se habitualmente através de um procedimento qualitativo que recorre à realização de culturas de sangue, designadas de hemoculturas.

A hemocultura é uma prova analítica, na qual o sangue colhido no paciente é introduzido e incubado em frascos contendo meio de cultura, que nos permite verificar a presença de microrganismos. A Unidade Hospitalar de Cuidados Intensivos é um setor de elevada complexidade pela natureza de doentes que recebe, ao qual está associado uma elevada taxa de mortalidade. Esta área hospitalar é constituída por pacientes com um estado de saúde muito debilitado e no qual, o risco de infeções nosocomiais é elevado. Foi realizado um estudo retrospectivo sobre o perfil microbiológico e de resistência bacteriana em hemoculturas da Unidade de Cuidados Intensivos da Unidade Hospitalar do Alto Minho, no período de 2005 a 2009, no laboratório de Microbiologia. Foram analisadas 125 amostras de pacientes com hemoculturas positivas, das quais 89 sujeitos eram do sexo masculino com idade média de 59,9 anos; e 36 sujeitos do sexo feminino com idade média de 68,6 anos. Relativamente ao grupo microbiológico, verificou-se uma maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa, tendo-se registado 31 casos de *Staphylococcus epidermidis*, 11 casos de *Staphylococcus haemolyticus* e 15 casos de *Staphylococcus hominis*; no grupo dos *Streptococcus spp* registaram-se 6 casos de *Enterococcus faecalis* e de 9 casos de *Streptococcus pneumoniae*; no grupo dos bacilos Gram-negativos oxidase negativa observaram-se 5 casos de *Escherichia coli* e 2 casos de *Serratia marcescens*. A menor prevalência foi observada para os bacilos Gram-negativos oxidase positiva, registando-se 7 casos de *Pseudomonas aeruginosa* e 3 casos de *Acinetobacter baumannii*. Em relação ao perfil de resistência e sensibilidade, nos microrganismos Gram-positivos, os *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram-se todos sensíveis à vancomicina, 100% resistentes à penicilina e 80% resistentes à oxacilina; os *Staphylococcus aureus* apresentaram-se todos sensíveis à vancomicina, todos resistentes à penicilina e aproximadamente 60% resistentes à oxacilina; os *Streptococcus spp* foram todos sensíveis à vancomicina e os *Enterococcus spp* 20% resistentes a este mesmo antibiótico. Nos microrganismos Gram-negativos mostraram-se 25 a 30% resistentes à ciprofloxacina, gentamicina e imipenem e os bacilos Gram-negativos oxidase negativa apresentaram resistência ao cefotaxime superior a 65%.

A ULSAM é constituída por uma Comissão de Controlo de Infeção que continuamente implementa programas de controlo, contudo face aos resultados apresentados e à realidade das infeções hospitalares, constitui um desafio diário aperfeiçoar e incrementar medidas que atendam cada vez mais a esta problemática.

ABSTRACT

The blood is a sterile liquid that in the presence of microorganisms may initiate a process of bacteremia. The detection of the pathogen is generally performed by a qualitative procedure using blood culture. This procedure is an analytical test, in which the blood specimen is introduced and incubated into bottles with culture medium and allows to verify the presence of microorganisms. The Hospital Intensive Care Unit is a sector highly complex due to the nature of patients they receive which is associated with a high mortality rate. This area comprises hospital patients with severely compromised state of health and in which the risk of nosocomial infections is very high. So, the objective of this work was to establish a retrospective study of blood cultures on the Intensive Care Unit, of Alto Minho Hospital Unit, in the period of 2005 to 2009, based on the results of the microbiology laboratory. We analyzed 125 samples from patients with positive blood cultures, of which 89 subjects were male with an average age of 59.9 years and 36 female subjects with an average age of 68.6 years. Concerning the isolated microorganisms, there was a greater prevalence of coagulase negative Staphylococci, being recorded 31 cases of *Staphylococcus epidermidis*, 11 cases of *Staphylococcus haemolyticus* and 15 cases of *Staphylococcus hominis*; in the group of *Streptococcus* spp there was 6 cases *Enterococcus faecalis* and 9 cases of *Streptococcus pneumoniae*; the group of oxidase negative Gram-negative bacilli 5 cases of *Escherichia coli* and 2 cases of *Serratia marcescens* were observed. The lowest prevalence was obtained for oxidase positive Gram-negative bacilli, 7 cases of *Pseudomonas aeruginosa* and 3 cases of *Acinetobacter baumannii*. Regarding the profile of antibiotic sensitivity, all Gram-positive microorganisms were sensitive to vancomycin and oxacillin-resistant, while Gram-negative showed up 25 to 30% resistance to ciprofloxacin, gentamicin and imipenem and above 65% of Gram-negative bacilli oxidase negative were resistant to cefotaxime.

ULSAM consists of an Infection Control Committee that continuously implements surveillance programmes to reduce the nosocomial infections, however given the results and facing the reality of hospital infections, is a daily challenge to improve and enhance measures to solve this increasingly problematic is a daily challenge.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho de Administração da Unidade Local de Saúde do Alto Minho, nomeadamente ao Dr. Franklim Ribeiro Ramos, Presidente do Conselho de Administração da Unidade Local de Saúde do Alto Minho Director Clínico da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho, pela autorização dada para a realização deste trabalho.

Ao Dr. José António Mota Freitas – Director do Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho, pela Orientação.

À Professora Doutora Maria Manuela Estevez Pintado – Investigadora da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, pela Co-Orientação.

Aos colegas da secção de Microbiologia, Dra. Adelina Santos, Dra. Sandra Vieira, Téc. Cristina Malta, Téc. Cristina Santos, Téc. Joana Araújo, e Téc. Maria Agonia, pelo apoio dado na recolha e interpretação de dados.

À minha família.

ÍNDICE

1. Introdução.....	9
1.1 Processo Infeccioso e Bacteriemia	9
1.2 Hemocultura	10
1.3 Agentes Bacterianos	12
1.3.1 Enterobactérias	12
1.3.2 Bacilos Gram-negativos não Fermentadores Oxidase Positiva	12
1.4 <i>Staphylococcus</i>	14
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	15
1.5 <i>Enterococcus spp</i>	17
1.6 Cápsula e Biofilme na proteção da Célula Bacteriana	17
1.7 Infecções Hospitalares (IH)	18
1.8 Unidade de Cuidados Intensivos	20
1.9 Medidas de Controlo da Infeção.....	21
1.10 Antimicrobianos Utilizados nas Infecções Hospitalares	23
1.11 Hemoculturas e o seu Diagnóstico Microbiológico	26
1.12 Objetivos do trabalho.....	27
2. Materiais e Métodos	28
2.1 Caracterização do Contexto de Investigação.....	28
2.2 Caracterização da Amostragem	28
2.3 Metodologia.....	28
2.4 Análise estatística	29
3. Resultados e Discussão.....	31
4. Conclusões Gerais	53
5. Trabalhos Futuros	54
6. Referências Bibliográficas.....	55

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1 – Prevalência de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina em países europeus.	16
Figura 2 – Distribuição dos sujeitos pelas faixas etárias com indicação da média e desvio-padrão.	37
Figura 3 – Análise comparativa entre homens e mulheres no que se reporta à estação do ano na colheita.	38
Figura 4 – Análise comparativa entre grupos microbiológicos de acordo com a estação do ano na colheita.	42
Figura 5 – Análise comparativa entre homens e mulheres no que se reporta aos grupos microbiológicos.	43
Figura 6 – <i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis / resistentes à Penicilina e Oxacilina.	44
Figura 7 – <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos sensíveis / resistentes à Penicilina e Oxacilina.	45
Figura 8 – Perfil de sensibilidade e resistência dos <i>Streptococcus spp.</i> a vários antibióticos	46
Figura 9 – Perfil de sensibilidade e resistência dos <i>Enterococcus spp.</i> à Vancomicina	47
Figura 10 – Perfil de sensibilidade e resistência dos Bacilos Gram- negativos oxidase negativa a diferentes antibióticos.	48
Figura 11 – Perfil de sensibilidade e resistência dos Bacilos Gram- negativos oxidase positiva a diferentes antibióticos.	49

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos potencialmente patogénicos associados a infeção na UCI. (Fonte: Allen, 2005)	20
Tabela 2 – Amostra base sem a aplicação dos critérios de exclusão.....	32
Tabela 3 – Percentagem de microrganismos por grupo microbiológico.	34
Tabela 4 – Caracterização geral da amostra por idade, sexo, estação do ano e grupo microbiológico.....	36
Tabela 5 – Caracterização da amostra por sexo H/M análise comparativa entre homens e mulheres.	40
Tabela 6 – Caracterização da amostra de acordo com o grupo microbiológico.....	42

1. Introdução

1.1 Processo Infeccioso e Bacteriemia

O corpo humano é constituído por microbioma com grande diversidade bacteriana, apoiada por microrganismos de baixa virulência, que num indivíduo saudável exercem um efeito protetor contra microrganismos potencialmente patogénicos (Silva et al, 2006). Desta forma, as barreiras imunitárias da mucosa protegem a boca e o trato gastrointestinal de uma possível invasão, evitando atingir outros locais tais como o trato renal e os compartimentos vasculares os quais se devem apresentar livres de bactérias (Allen, 2005). Segundo o mesmo autor, num estado de doença existe uma resposta deficiente das defesas físicas e imunológicas, e a resistência normal à infeção pode ser reduzida, sendo nesta etapa que a colonização pode vir a tornar-se numa infeção; desta forma, toda a bactéria é potencialmente patogénica se estiver localizada num local onde não é encontrada em condições normais.

A infeção pode ser endógena ou exógena (Oldfield et al, 2008). De acordo com estes autores, na infeção endógena, o patogénico que provem de um ou mais locais não estéreis, como a boca, intestino, o trato genital e urinário, ou da pele, adquire o papel de invasor. A capacidade de invasão pelo patogénico está associada também a um défice imunitário do paciente e à quebra das barreiras naturais do organismo, por exemplo através do uso de cateteres e tubos endotraqueais. O uso de antibióticos leva também a uma redução da flora normal o que proporciona o crescimento de outros microrganismos (Tsai et al, 2005).

O organismo de um indivíduo saudável tem um sistema sanguíneo estéril, contudo, diante de doenças infecciosas surge um processo de bacteremia, no qual o, ou os agentes infecciosos promovem a invasão, colonização e a sua subsequente multiplicação na corrente sanguínea (Forbes et al, 2001).

Na realização de um possível diagnóstico de bacteremia deve-se ter em conta a temperatura corporal do doente, $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ou $\leq 36^{\circ}\text{C}$, taquicardia ($\geq 90/\text{min}$), taquipneia ($\geq 20/\text{min}$) e leucopenia com uma contagem de leucócitos ≥ 12 ou $\leq 4 \times 10^9 /\text{L}$ (Leth & Moller, 2006).

1.2 Hemocultura

A bacteriemia pode ser detetada através da realização de um procedimento qualitativo para a cultura e isolamento de microrganismos a partir de uma amostra de sangue designando-se hemocultura (Silva et al, 2006). Elevados níveis de procalcitonina ($> 2 \mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) e uma falência sequencial dos órgãos são uma previsão de que poderemos obter um resultado positivo na hemocultura (Previsdomini et al, 2012).

A hemocultura é uma prova analítica, na qual o sangue colhido ao paciente é introduzido em frascos constituídos por meios de cultura que nos permitem determinar se existe a presença de microrganismos na corrente sanguínea do paciente (Acuña, 2011). Segundo o mesmo autor, a colheita destas amostras de sangue deve ser realizada obedecendo a técnicas estéreis e metodologias pré estabelecidas para que se reduza ao máximo o número de hemoculturas contaminadas. A contaminação está associada a um aumento no tempo de hospitalização do doente, o que resulta num aumento de 20 a 39% dos custos de internamento para que se proceda à correta administração do antibiótico (Hall et al, 2011). A contaminação das hemoculturas leva à realização de novas colheitas para confirmação do quadro clínico (Stamilio et al, 2004). Segundo os mesmos autores as hemoculturas devem ser obtidas antes da toma de qualquer antibiótico, para desta forma evitarmos o uso desnecessário do mesmo e prevenir uma possível resistência. Quando o antibiótico é administrado na forma e dose correta, existe uma diminuição da taxa de mortalidade do paciente (Bartley et al, 2005). Recomenda-se que cada grupo de hemoculturas inclua pares de frascos para aeróbios e anaeróbios, pois os microrganismos que provocam infeções no sangue são variados (aeróbios, anaeróbios, fungos e microrganismos de crescimento lento).

Durante o tempo de incubação, as hemoculturas, ficam sujeitas a leituras periódicas e a uma verificação diária dos resultados, o que nos doentes com sépsis é bastante pertinente, pois estão associados a altas taxas de morbidade e mortalidade (Eggimann et al, 2004). Essas taxas variam de 20 a 40% dependendo da administração correta dos anti microbianos, principais responsáveis pela diminuição da mortalidade, razão pela qual a hemocultura constitui um exame de grande valor preditivo (Macias & Leon, 2005).

Em 2008 nos Estados Unidos cerca de US \$ 14,6 biliões foram gastos em internamentos por seticemia, e de 1997 a 2008, os custos inerentes a esta condição aumentaram anualmente uma média de 11,9% (Hall et al, 2011).

As infecções da corrente sanguínea representam 12% das infecções nosocomiais das Unidades de Cuidados Intensivos (Eggimann et al, 2004).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVS), a invasão do sangue por microrganismos, acontece normalmente a partir dos seguintes mecanismos (Harbarth et al, 2003):

- a) Por penetração a partir de um foco primário de infecção, através de vasos linfáticos para o sangue;
- b) Por entrada direta na corrente sanguínea, via agulhas, ou também através de outros dispositivos vasculares, como cateteres.

Ainda segundo a mesma fonte a presença de bacteremia ou fungemia, podem ser atribuídas a um déficit nas defesas do hospedeiro em localizar e neutralizar uma determinada infecção no seu foco inicial, ou também, aquando de uma falha médica, em remover ou mesmo drenar um foco infeccioso. Regista-se o facto de apesar de qualquer infecção se poder disseminar para o sangue, a bacteremia e a fungemia, possuírem uma maior prevalência no caso da existência de dispositivos intravasculares (cateteres), infecções abdominais, do trato respiratório e urinário (Cabral & Poveda, 2008).

1.3 Agentes Bacterianos

1.3.1 Enterobactérias

Os agentes bacterianos responsáveis por 50% das seticemias são da família das Enterobactérias, que se caracterizam por serem oxidase negativa, sendo que é a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância clínica (Curtis, 2008). Segundo a mesma fonte e de acordo com dados da ANVS, são considerados atualmente: 27 gêneros que incluem 102 espécies e 8 grupos indefinidos.

Curtis (2008), salienta que a maioria das Enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais, representando 80% ou mais de todos os bacilos Gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. As Enterobactérias mais predominantes são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp, e os seus principais gêneros de importância clínica são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp (Silva et al, 2006).

1.3.2 Bacilos Gram-negativos não Fermentadores Oxidase Positiva

Dentro dos bacilos Gram-negativos temos ainda o grupo dos não fermentadores que são caracterizados por serem aeróbios, não esporulados, incapazes de utilizar hidratos de carbono, como fonte de energia através da fermentação, degradando-os pela via oxidativa (Curtis, 2008).

A caracterização deste grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecções hospitalares pois apesar de a sua incidência ser pequena, quando comparada com outros agentes etiológicos, geralmente eles apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar graves infecções (Trautmann et al, 2005). Segundo dados do mesmo autor, estas bactérias colonizam e causam infecções, em especial, em pacientes provenientes de Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) e submetidos a procedimentos invasivos.

Os principais bacilos não fermentadores com importância clínica são: *Acinetobacter* spp, *Alcaligenes* spp, *Achromobacter* spp, *Bordetella bronchyseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas*

luteola, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas spp*, entre outros (Forbes et al, 2001).

Em particular a *Stenotrophomonas maltophilia* pode ser isolada do ser humano, de animais, solo, alimentos e produtos farmacêuticos (Tsai et al, 2005). É considerada uma das causas severas de bacteriemia, e está associada a altas taxas de mortalidade (Paez & Costa, 2008). De acordo com o mesmo autor, os riscos de colonização e infecção advêm da exposição do paciente a antibióticos de largo espectro, uma hospitalização prolongada, um internamento na UCI, ventilação mecânica e o uso de procedimentos intravasculares e traqueotomia.

No caso da *Pseudomonas spp*, esta possui uma resistência inata a um vasto espectro de antimicrobianos, podendo ser encontrada em todo o ambiente hospitalar, em reservatórios húmidos, nomeadamente, nos alimentos, flores cortadas, sanitários, esfregões de limpeza do chão entre outros ambientes (Yakupogullari et al, 2008). Estudos revelam que é o quinto organismo mais frequentemente encontrado em casos de seticemia e, está associado a níveis de morbidade e mortalidade de 40 a 50% (Trautmann et al, 2005). De acordo com o mesmo autor, raramente é encontrada na comunidade, contudo na área hospitalar as taxas de colonização nos pacientes podem chegar a 30%, e 100% em algumas unidades neonatais. A *Pseudomonas aeruginosa* tem um grande potencial invasivo especialmente em doentes ventilados, e consegue induzir em alguns dias enzimas que lhe confirmam resistência. Esta resistência pode ser adquirida por um gene em cada célula filha ou através de vetores de material extra-cromossómico tais com os plasmídeos ou bacteriófagos (Curtis, 2008).

O *Acinetobacter baumannii* é um microrganismo ubiqüitário, que se distribui pela água e pelo solo, estando presente na pele e na membrana mucosa dos seres humanos, e em superfícies húmidas (Wybo, 2007). Refere ainda que o *Acinetobacter baumannii* não é considerado um microrganismo com um elevado grau de virulência, mas possui uma particularidade que faz com que se torne num microrganismo emergente nas infeções nosocomiais, que consiste no seu elevado tempo de sobrevivência num ambiente hospitalar. Desta forma, surge como um grande desafio, pois está associado a um estado de saúde débil do doente, a um processo de ventilação mecânica prolongada e à presença de cateter venoso central, sendo a sua taxa de colonização elevada, e estima-se que num período não epidémico se situe nos 27% (Curtis, 2008). A taxa de mortalidade de infeções

nosocomiais por *Acinetobacter baumannii* situa-se entre os 50-60% (Karabay, 2012). A transmissão horizontal de uma estirpe resistente de *Acinetobacter baumannii* em hospitais resulta frequentemente em infecção nosocomial persistente que pode conduzir ao encerramento das UCI, de forma a proceder a uma descontaminação de toda a área, pois uma vez estabelecida, torna-se muito delicado eliminá-la, devido á sua natureza ubiquitária, e á sua capacidade em sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes saprófitos como as superfícies inanimadas (Forbes et al, 2001).

1.4 *Staphylococcus*

Outro tipo de microrganismo causador de sépsis pertencem à família dos *Staphylococcus spp* que se caracterizam por serem cocos individuais Gram-positivos, em pares ou pequenas cadeias com uma forte tendência para a formação de “clusters” e distinguem-se dos *Streptococcus spp* por serem catalase positiva. Adicionalmente, são imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, crescem através da respiração aeróbia ou da fermentação, são frequentemente encontrados na flora normal da pele e das membranas mucosas do ser humano e são os mais resistentes no meio ambiente (Casey et al, 2007). Estes autores salientam ainda que este tipo de bactérias pode sobreviver por meses em amostras clínicas secas, pois são relativamente resistentes ao calor. No entanto, e segundo a mesma fonte, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhoria das condições sanitárias e de um aumento nas medidas de controlo de infeção hospitalar (IH), este tipo de microrganismos continua a ser um dos mais importantes agentes patogénicos para o homem. A sua parede celular é composta por peptidoglicano e ácidos teicoicos, aos quais estão ligados adesinas e exotoxinas (Cabral & Poveda, 2008). Várias espécies de *Staphylococcus spp*, particularmente, *Staphylococcus epidermidis* e algumas estirpes de *Staphylococcus aureus* produzem biofilme no qual, existe a adesão da bactéria superfície, seguida de adesão bactéria-bactéria, formando camadas múltiplas de bactérias, ficando estas protegidas da fagocitose e da ação dos antibióticos, tornando-se clinicamente muito difícil o tratamento do paciente (Harris & Richards, 2006).

1.4.1 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

O ser humano alberga na sua nasofaringe e na pele *Staphylococcus aureus*, principalmente os indivíduos que necessitam da administração de drogas intravenosas, insulino-dependentes, pacientes com problemas dermatológicos, ou que necessitam da utilização prolongada de cateteres, e o técnico de saúde (Allen, 2005).

Staphylococcus aureus diferencia-se dos outros *Staphylococcus spp* por ser positivo para a coagulase, enzima que coagula o sangue ao transformar o fibrinogénio em fibrina, o que provoca a formação de coágulos à volta da bactéria, dificultando o reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema imunitário (Haddadin et al, 2002). Estes autores referem ainda que esta bactéria produz fatores de patogenicidade tais como enzimas das quais fazem parte: a catalase, coagulase, hialuronidase, β -lactamase.

O primeiro caso de MRSA, segundo o mesmo autor, pelo gene de resistência mec-A remonta-nos para o ano de 1961. Recentemente, mostra-se que a taxa de MRSA na comunidade tem vindo a sofrer um decréscimo (menor do que 1%) comparativamente com o meio hospitalar (5-10%). Estes valores devem-se a variados fatores como a exposição, por vezes abusiva, aos antibióticos, a admissão em UCI, cirurgias e contato com pacientes que são portadores de MRSA. Ainda segundo os mesmos autores, a proporção de casos de bacteriemia por MRSA aumentou de 1 a 2% em 1990-1992 para 43% em 2002.

Os indivíduos saudáveis são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, ou através da pele e membranas mucosas do ser humano, objetos inanimados ou pelo contato direto com outros humanos ou por aerossóis, e podem alojar este microrganismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina (Souza & Figueiredo, 2008).

Durante os últimos 20 a 30 anos, as estirpes de MRSA converteram-se numa das principais causas de infeção nosocomial (Rubinstein, 2008). Os MRSA que apresentam resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos) e frequentemente a outras classes de antimicrobianos, restringindo muito as opções terapêuticas para o paciente. Adquiridos na comunidade emergiram no mundo inteiro no final dos anos 90, sendo atualmente um problema importante ao nível da Saúde Pública (Bisaga et al, 2008).

A taxa de resistência à meticilina dos *Staphylococcus aureus* varia consideravelmente de um país para outro. Os dados mais recentes são de 2007 e segundo

EARSS a proporção de MRSA na Europa é elevada, especialmente nos países ocidentais e mediterrânicos. Os países nórdicos apresentam uma proporção inferior a 5%, enquanto nos países mediterrânicos, Reino Unido e Irlanda, a prevalência varia entre 25% a 50%. Em França, na Turquia e na Eslovénia, as proporções de MRSA continuam em decréscimo (EARSS, 2007). Existem quatro países, segundo os mesmos autores, cujas proporções de MRSA estão acima dos 40%, que são Portugal, Malta, Grécia e Espanha.

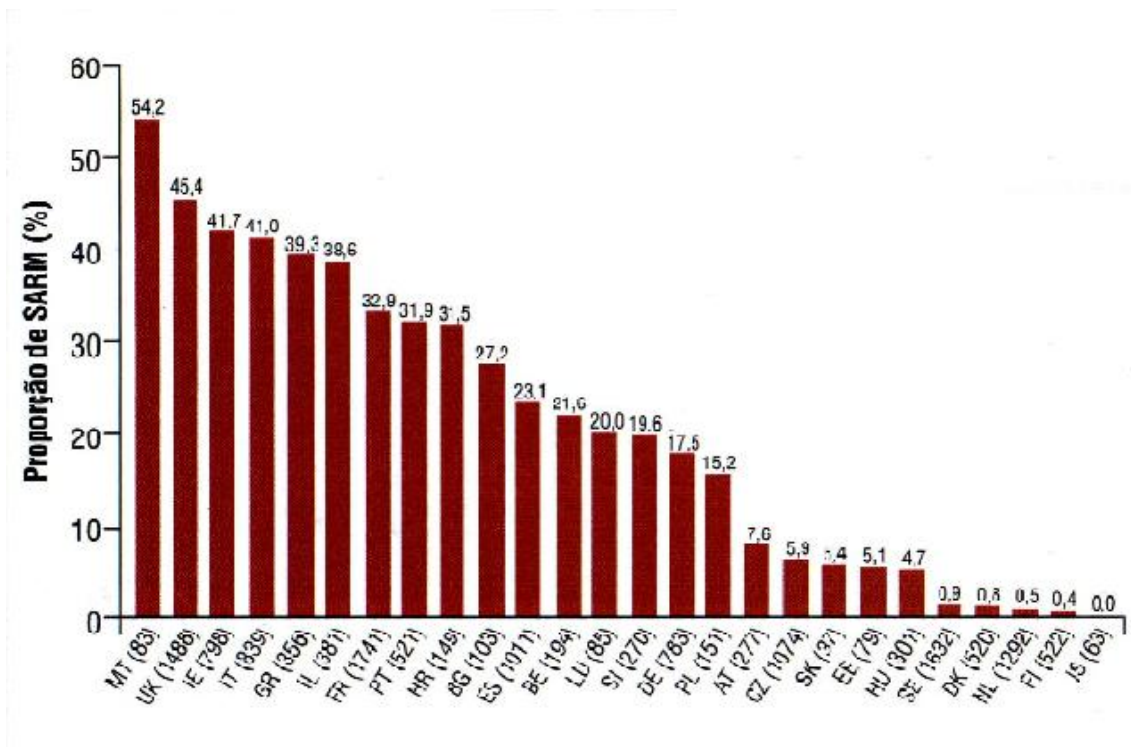


Figura 1 – Prevalência de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina em países europeus. (fonte: www.earss.rivm.nl)

As infecções causadas por MRSA são principalmente adquiridas em hospitais, pela permanência nestes locais por longos períodos de tempo, pela colonização ou infecção, por exposição a antibióticos dentro do hospital, admissão a uma unidade de tratamento intensivo, cirurgias, entre outras (Rubinstein, 2008). A sua prevalência em infecções adquiridas em hospitais é maior do que adquiridas na comunidade, visto que a maioria das infecções comunitárias por *Staphylococcus aureus* são sensíveis à metilina (Rizzo, 2005). O *Staphylococcus aureus* é considerado o maior e mais virulento patogénico, que coloniza e infeta tanto os pacientes hospitalizados com uma diminuição da imunidade, quanto os indivíduos imuno-competentes da comunidade (Bisaga et al, 2008). Segundo os mesmos

autores, a problemática do MRSA consiste nas opções reduzidas de administração de antibióticos e não na sua virulência.

A transmissão destas bactérias pode ser feita através do contacto entre pessoas, principalmente através das mãos, o que num meio hospitalar é de extrema importância devido ao contacto profissional de saúde – doente, desta forma, o simples ato de lavar as mãos após examinar ou entrar em contacto com os pacientes diminui muito o risco de transmissão deste microrganismo (Loveday et al, 2006).

1.5 *Enterococcus spp*

No meio hospitalar, outro grupo de microrganismos que apresenta um aumento de incidência são os *Enterococcus spp*, também cocos Gram positivos, mas catalase negativa frequentemente encontrados nas fezes ou no sangue após uma cirurgia intestinal (Carling, 2007). O aumento da sua incidência em grande parte é devido à utilização de anti microbianos de largo espectro, muitos dos quais com atividade mínima para estes microrganismos, como é o caso das quinolonas (Furtado, 2005). O uso da vancomicina no tratamento de MRSAs resultou no surgimento de *Enterococcus spp* resistentes à vancomicina (VRE) (Allen, 2005).

A resistência à vancomicina é recente e ocorre devido à produção de precursores do peptidoglicano na parede celular que se ligam à vancomicina, impedindo a sua acção no bloqueio da síntese da parede celular (Pearman, 2006).

1.6 Cápsula e Biofilme na proteção da Célula Bacteriana

A cápsula contribui para a virulência bacteriana através da diminuição da eficácia da fagocitose no animal não imune (Sousa, 2005).

Segundo o mesmo autor, os biocidas, desinfetantes e antibióticos não conseguem ser eficazes perante o microrganismo em biofilme. A diminuição da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos nos biofilmes deve-se ao facto da deficiente penetração do antibiótico, da sua interação com os constituintes do biofilme, ao crescimento lento ou ao começo da fase estacionária dos microrganismos no biofilme, ao stress adaptativo e à formação de células resistentes.

Como o autor referiu no parágrafo anterior, os microrganismos sem crescimento ou em fase estacionária são menos susceptíveis a uma variedade de antibióticos. O

crescimento mais lento que ocorre no biofilme pode dever-se a uma depleção local de nutrientes, anoxia ou baixo pH, que influenciam diretamente a ação dos antibióticos.

1.7 Infecções Hospitalares (IH)

De acordo com o Centro de Controlo e Prevenção de Doença (CDC), a infeção nosocomial refere-se a um conjunto de parâmetros que definem uma infeção grave. Tendo em conta uma combinação de variados fatores, como o tratamento microbiológico e antibioterapia a que o paciente é sujeito, conseguimos ter uma maior sensibilidade para prever uma infeção hospitalar (Leth & Moller, 2006).

O CDC, estima que são gastos 4,5 milhões de dólares por ano nos Estados Unidos em 2,5 milhões de IHS, de entre as quais 30,000 resultam na primeira causa de morte e 70,000 numa causa indireta (Guinan et al, 2005). Uma melhor e adequada antibioterapia e um precoce diagnóstico da possível infeção, podem ser decisivos na redução da mortalidade e morbidade das IHS (Curtis, 2008). Ao longo dos anos, o laboratório de microbiologia tem desenvolvido novas ferramentas no suporte e auxílio ao controlo da infeção (Struelens et al, 2004). A capacidade de diagnóstico baseado nos métodos tradicionais de cultura e microscopia vão agora sendo complementadas com novos equipamentos e tecnologias, tendo por base a biologia molecular, que possuem uma maior fiabilidade, sensibilidade e especificidade, e que permitem a aquisição de resultados, para o clínico, num menor tempo útil de resposta (Schabrun & Chipchase, 2006).

O aumento da frequência das IHS por microrganismos resistentes, observado nas últimas décadas, constitui uma realidade evidente nas UCIs (Curtis, 2008). Esta problemática faz-se sentir a nível hospitalar e comunitário, podendo transforma-se num problema de saúde pública de dimensão transnacional com implicações económicas, sociais e políticas (Macias & Leon, 2005).

Os principais fatores responsáveis pela emergência da resistência microbiana na UCI são constituídos pelo uso excessivo de antibióticos e a baixa conformidade com os protocolos/medidas de controlo de infeção (Oliveira, 2006). Como exemplo do que se acaba de referir, temos o uso abusivo de drogas de largo espetro e ainda o facto de muitos dos antibióticos prescritos serem inadequados, o que se estima que ocorra numa percentagem de 25 a 50% dos casos de prescrição (Silva, 2006). Ainda no que concerne à resistência microbiana, (Oliveira, 2006) refere que de acordo com o CDC, de Atlanta nos

Estados Unidos, as IHS originadas por microrganismos resistentes, aumentaram de forma dramática no ano de 1990 e, se comparados aos últimos 5 anos, regista-se um aumento de 89% de *Pseudomonas aeruginosa* resistente às quinolonas, 55% de *Enterococcus* resistente à vancomicina, 30% de MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem.

O uso abusivo de antimicrobianos resulta no aparecimento de bactérias multiresistentes, que são comumente definidas como, não sendo, suscetíveis aos antibióticos de primeira linha (Struelens et al, 2004). O desenvolvimento da sua resistência a antibióticos realiza-se através de uma mutação genética natural ou induzida, em que consequentemente as estirpes mutantes criam diversos mecanismos de inibição da atividade dos antimicrobianos, (Pearman, 2006). Existe o potencial de transferência de genes de resistência de uma estirpe para outra, através do deslocamento de fragmentos de ADN; segmentos instáveis de ADN cromossômico (transposões) que podem ser transferidos, bem como, fragmentos de ADN extra-cromossômicos (plasmídeos) levando genes de resistência de uma estirpe para outra (Menezes et al, 2003). Pode ocorrer também e, segundo a mesma fonte, a transferência de fragmentos de ADN veiculados por bacteriófagos (vírus que infetam bactérias); este tipo de transferência pode ocorrer inclusive entre bactérias de gêneros diferentes. O uso de antibióticos induz uma pressão seletiva sobre as estirpes bacterianas, favorecendo a preservação das estirpes que sofreram mutação genética para a resistência em detrimento das estirpes sensíveis (Wybo et al, 2007). A disseminação destes agentes ocorre, particularmente quando as medidas básicas no controlo das IHS não são respeitadas; os seus reservatórios no ambiente hospitalar são principalmente os pacientes infetados e/ou colonizados (Carling et al, 2008). Entretanto, pode ocorrer o reservatório ambiental através de objetos ou equipamentos contaminados, contudo a equipa de saúde pode atuar também como reservatório, através de mãos contaminadas, caracterizando-se, desta forma uma colonização com caráter transitório (Carriço & Rebmann, 2008).

As estirpes de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos apresentam uma opção terapêutica restrita, no entanto não apresentam maior potencial de transmissibilidade ou virulência quando comparadas com as estirpes sensíveis (Dupont, 2007).

1.8 Unidade de Cuidados Intensivos

A UCI está associada a uma elevada taxa de mortalidade, alguns estudos afirmam que, em pacientes com infeções respiratórias a taxa de mortalidade pode variar de 30 a 53% (Trautmann et al, 2005).

Os patogénicos mais importantes numa UCI são: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Macias & Leon, 2005).

Neste momento são 15 os microrganismos potencialmente patogénicos associados a infeções na UCI, que podem ser divididos em dois grupos: os que fazem parte da flora normal de um indivíduo saudável e aqueles que não fazem parte da flora normal, são exógenos e colonizam doentes em estado terminal (Allen, 2005).

Tabela 1 – Microrganismos potencialmente patogénicos associados a infeção na UCI. (Fonte: Allen, 2005)

Organismos transportados por indivíduos saudáveis	(%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	60
<i>Haemophilus influenzae</i>	25-80
<i>Moraxella catarrhalis</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	99
<i>Candida albicans</i>	30
<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina (MSSA)	30
Organismos transportados por indivíduos doentes	
<i>Klebsiella spp.</i>	
<i>Enterobacter spp.</i>	
<i>Citrobacter spp.</i>	
<i>Proteus spp.</i>	
<i>Morganella spp.</i>	
<i>Serratia spp.</i>	
<i>Acinetobacter spp.</i>	
<i>Pseudomonas spp.</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	

A UCI é um setor hospitalar de elevada complexidade, e no qual o risco de infeções nosocomiais é o mais elevado (Harris & Richards, 2006). De acordo com estes autores, a alta prevalência é resultante de fatores intrínsecos à necessidade de cuidados intensivos como: doentes politraumatizados, doenças de base grave, cirurgias de risco elevado, má nutrição, extremos de idade e imunossupressão, utilização de técnicas invasivas que ultrapassam as barreiras naturais de proteção (entubação endotraqueal, cateteres intravasculares e algaliação) impedindo a eliminação de microrganismos pelos mecanismos fisiológicos, um défice nutricional resultante da dificuldade de ingestão associada ao aumento da procura metabólica, um internamento de pacientes colonizados ou infetados que aumentam o risco de infeção cruzada, uso elevado de antibióticos de largo espectro. Para além destas razões, surgem ainda com responsabilidade, o mau diagnóstico da infeção, a má acessibilidade aos fármacos, a falta de informação e a “globalização” (Curtis, 2008).

A UCI destaca-se como o principal ambiente que contribui para uma maior taxa de IHS em relação aos outros setores hospitalares, representando um risco médio cinco a dez vezes maior do que as outras áreas, correspondendo em média a cerca de 25% do total das IHS (Allen, 2005). Segundo o mesmo autor, e de acordo com o CDC as infeções adquiridas na comunidade são aquelas presentes ou incubadas no momento da admissão hospitalar, porém, todas as outras infeções associadas ao ambiente hospitalar são consideradas nosocomiais, inclusive as que surgem no período de 14 dias após a alta hospitalar.

De acordo com dados de um estudo europeu de prevalência de infeções nas UCIs (EPIC), elaborado em 10.038 dos pacientes internados em 1417 unidades deste setor hospitalar, as infeções na corrente sanguínea representam 12% das infeções nosocomiais (Eggimann et al, 2004). A mesma fonte salienta que as infeções sanguíneas nosocomiais nas UCIs devem-se ao uso de cateteres venosos centrais e uma prática deficiente das regras de higienização, aquando da sua inserção nesta unidade, tendo em conta, principalmente a higienização das mãos por parte do técnico de saúde.

1.9 Medidas de Controlo da Infeção

A desinfeção adequada das mãos dos profissionais de saúde, dos equipamentos médicos e das superfícies contaminadas são factores críticos na prevenção da transmissão

de microrganismos (Lankford et al, 2005). Assim sendo, a viabilidade dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, é variada e tem sido previamente descrita, como exemplo, os *Enterococcus spp* conseguem sobreviver em variados tipos de superfícies secas, utilizadas nos cuidados de saúde, por períodos prolongados, até 60 dias. Segundo o mesmo autor, demonstra-se ainda que muitos microrganismos conseguem sobreviver em determinados materiais esterilizados.

As bactérias diferem no seu grau de sobrevivência fora do hospedeiro humano e no contexto hospitalar, as espécies que permanecerem viáveis possuem uma grande probabilidade de transmitirem a infeção e, portanto uma vantagem competitiva no ambiente hospitalar (Hansen et al, 2007).

A viabilidade dos organismos Gram-positivo e Gram-negativo sob determinadas condições tem sido descrita por vários autores. As infeções como as provocadas por VRE e pela *Pseudomonas aeruginosa* estão relacionadas com a contaminação de superfícies, equipamentos, e com a higienização das mãos dos trabalhadores de saúde (Kim et al, 2012). Outros estudos verificaram a sobrevivência destes organismos em bancadas de cloreto de polivinil, nas camas, e nos equipamentos de cuidados de saúde (Brady et al, 2009). Adicionalmente, a composição de determinadas fibras têxteis, de estruturas e materiais de construção do edifício, paredes e assoalhados podem servir de reservatório, e desta forma contribuir para a sobrevivência ou o crescimento de bactérias (Sherlock et al, 2009). Apesar das medidas de precaução e isolamento serem efetivas, estudos confirmam que a contaminação do ambiente na UCI pode colonizar e infetar os pacientes (Carling et al, 2007).

O doente hospitalizado com MRSA, geralmente é colocado em isolamento de contacto para evitar a propagação da bactéria (Green et al, 2006). Segundo os mesmos autores, as pessoas saudáveis não se contaminam quando colocadas em contato com doentes infetados ou colonizados por MRSA, como por exemplo, os familiares que visitam o hospital; contudo para o doente da cama ao lado essa contaminação pode ser fatal. Ainda segundo a mesma linha de orientação, a bactéria MRSA pode ocorrer na comunidade, no entanto, trata-se de uma bactéria tipicamente hospitalar, e quando o seu aparecimento ocorre na comunidade é comum responder a um espectro mais amplo de antibióticos alternativos, sendo mais fácil o seu tratamento.

De acordo com Merle et al (2007) os profissionais de saúde devem esclarecer o paciente dos riscos associados aos procedimentos médicos e às IHS, pois deste modo facultamos ao doente a sua participação nas decisões clínicas, podendo reduzir as más práticas de higienização. Segundo a mesma fonte, em França o governo decretou que o profissional de saúde é obrigado a colocar à disposição do paciente e, de acordo com a sua condição clínica, toda a informação relativa aos riscos de uma possível infecção nosocomial em função dos procedimentos que devem ser realizados.

Os técnicos e trabalhadores de saúde devem possuir competências no controlo e prevenção de IHS: adquirir a noção dos diferentes tipos de microrganismos e a importância da resistência antimicrobiana no tratamento das IHS; ter o conhecimento de como os microrganismos podem ser transmitidos nos cuidados de saúde e aqui saber distinguir o conceito de limpo, desinfetado e esterilizado, e o procedimento para o conseguir (Carriço & Rebmann, 2008).

Segundo Brady et al (2008) existem meios de comunicação tais como os telefones e computadores que não sofrem uma adequada descontaminação, em algumas unidades hospitalares 80 a 92% destes não são descontaminados, provocando uma possível transmissão cruzada de bactérias.

1.10 Antimicrobianos Utilizados nas Infecções Hospitalares

Os antibióticos glicopeptídicos que incluem a vancomicina e teicoplanina inibem a síntese da parede celular bacteriana. A vancomicina é um antibiótico bacteriolítico, activo contra bactérias em crescimento, inibidor da biosíntese do peptidoglicano na fase membranar (Sousa, 2005). É o fármaco de eleição na actualidade para o tratamento de infeções graves causadas por bactérias Gram-positivas e também por *Staphylococcus aureus* resistentes às β -lactamases (Gould, 2008).

O número de antibióticos com acção nos MRSA's é limitado e o seu uso deverá ser criterioso; o fármaco mais administrado é a vancomicina, o que torna o processo mais dispendioso, visto tratar-se de um antibiótico estritamente de uso hospitalar não administrável por via oral (Souza & Figueiredo, 2008).

Os aminoglicosídeos são um grupo de fármacos bactericidas, inibidores de síntese proteica das bactérias sensíveis. Diversos aminoglicosídeos funcionam como antibióticos

que são efectivos contra certos tipos de bactérias. Incluem a amicacina, gentamicina e tobramicina (Sousa, 2005).

Outro grupo de antimicrobianos frequentemente utilizados na prática clínica são as quinolonas, do qual faz parte a ciprofloxacina, são caracterizadas por serem antibióticos de síntese química, de largo espectro de ação, abrangendo microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, incluindo o MRSA e a *Pseudomonas aeruginosa*, possuindo ainda ótimas características farmacocinéticas, como uma excelente biodisponibilidade e difusão tecidual (Pinheiro & Dutschmann, 1995).

De acordo com a mesma fonte, as quinolonas estão estruturalmente relacionadas com ácido nalidixico, pois têm um mecanismo de ação farmacológica semelhante, que atua na inibição da DNA-girase. A emergência de resistências a este tipo de fármacos situa-se entre as bactérias Gram-negativas, sendo que é rara nas *Enterobacteriaceae*, mas frequente na *Pseudomonas aeruginosa*, e nas Gram-positivas, entre as quais a resistência é rápida e frequente, sendo exemplo o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulase negativo* e *Enterococcus spp.* Esta resistência às quinolonas resulta de uma alteração na subunidade A da DNA-girase e do lipolissacárideo que faz parte da parede celular, responsável pela permeabilidade ou impermeabilidade da bactéria a este antimicrobiano (Pinheiro & Dutschmann, 1995).

Os carbapenemos dos quais fazem parte o imipenem e o meropenem, são outro grupo de drogas utilizadas para tratar infeções por patogénicos como a *Pseudomonas spp.*, são os antibióticos β -lactâmicos de maior espectro de atividade. No entanto, estes microrganismos também já demonstram resistências a este grupo (Crespo, 2004). O referido estudo salienta ainda, que nos últimos anos se descobriu que esta resistência não é só devida à impermeabilidade celular bacteriana, tal como no caso das quinolonas, mas também a um grupo de enzimas que hidrolisam este tipo de fármacos, as metalo-lactamases (MAL).

Recentemente, o aparecimento de estirpes de MRSA e VRE, fez surgir uma nova classe de antibióticos, as oxazolidinonas, como a Linezolida, cujo modo de acção é a inibição da síntese proteica, com um mecanismo bacteriostático. Este antibiótico tem um mecanismo de ação diferente pois não exhibe reacções cruzadas com os outros antibióticos. (Furtado et al, 2005).

Segundo os mesmos autores, estudos clínicos recentes, demonstram que a Linezolida é actualmente uma alternativa válida em casos de resistência aos glicopeptídeos clássicos no tratamento de infeções por Gram-positivos resistentes, e poderá futuramente ser uma arma importante, se convenientemente usada, no combate ao incremento das infeções nosocomiais causadas por MRSA.

De acordo com Boyce et al (2007) o uso excessivo de antibióticos, nas UCIs, conduz a uma pressão contínua e intensiva no contexto microbiótico local, originando assim, uma maior incidência de bactérias resistentes. Desta forma, destacam-se como bactérias multirresistentes das IHS: MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* resistente às quinolonas, VRE e bacilos Gram-negativos com beta-lactamases de largo espectro (ESBL) (Cabral & Poveda, 2008). As beta-lactamases são enzimas com considerável atividade hidrolítica produzidas por algumas bactérias e são responsáveis pela sua resistência a antibióticos beta-lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, e carbapenemos (Tragante et al, 2008). Este tipo de antibióticos possui na sua estrutura molecular um anel de quatro átomos conhecido como beta-lactama, e são tipicamente usados para tratar um largo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Souza & Figueiredo, 2005).

Alguns organismos Gram-negativos como a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Enterobacter cloacae* e a *Stenotrophomonas maltophilia* apresentam um sério problema de resistência antimicrobiana (Allen, 2005).

Assim, a grande incidência de IHS por mecanismos de multi-resistência, justifica a necessidade de capacitar os laboratórios de microbiologia para detetarem e comunicarem com eficácia e rapidez os resultados obtidos, para que atempadamente possam ser tomadas medidas de controlo adequadas (Struelens, 2004).

A compreensão dos mecanismos de resistência é muito importante para uma maior eficácia na identificação e controlo da infeção (Sequeira, 2004). Para o autor referenciado, torna-se fundamental rever os mecanismos de ação dos antibióticos tais como: alteração da membrana celular; a inibição da síntese dos ácidos nucleicos, da parede celular, do metabolismo, e da síntese proteica. O conhecimento dos mecanismos de resistência das bactérias é também importante a todo o processo, podendo os mesmos, ser de base genética (intrínseca ou adquirida) ou bioquímica (diminuição da acessibilidade do antibiótico ao alvo; destruição ou inativação enzimática; alteração ou substituição das moléculas alvo) (Allen, 2005). Segundo o mesmo autor, para o controlo das resistências é fundamental

assegurar três estratégias: programas eficazes de controlo da infeção; vigilância epidemiológica; otimização da utilização de antibióticos (antibiótico necessário, o mais estreito espectro, concentração correta, momento oportuno, via segura, doente certo, alternativa mais barata), determinando a existência de uma “política de antibióticos”. O controlo adequado às resistências, tem de ser feito à escala global, o que implica uma tomada de consciência generalizada, o reconhecimento e estudo do problema, e a importância de uma abordagem multidisciplinar.

1.11 Hemoculturas e o seu Diagnóstico Microbiológico

As amostras de sangue devem ser colhidas de uma veia preferencialmente localizada no antebraço, sem a utilização de anticoagulante, e cada amostra colhida de locais diferentes. A assepsia da pele deve ser com álcool isopropílico ou etílico a 70% durante 30 segundos e no fim aplicar uma solução iodada (Acuña, 2011).

O sangue deve ser colhido logo após aparecimento dos primeiros sintomas de infeção, tendo em conta que as bactérias são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea pelas células do sistema reticuloendotelial. Por esta mesma razão recomenda-se extrações separadas por períodos de tempo concretos.

Antes de proceder à extração deve-se limpar a tampa do frasco de hemocultura com um antiséptico e deixar que a tampa seque para que o antiséptico utilizado não entre dentro do frasco de hemocultura aquando da inoculação do sangue. Os frascos de hemocultura devem inocular-se rapidamente para evitar a coagulação do sangue dentro da seringa. O frasco de hemocultura anaeróbia deve ser o primeiro a ser inoculado de forma a evitar a entrada de ar.

Após a colheita da amostra sangue, utilizando técnicas estéreis, o sangue é inoculado para um ou mais frascos de hemoculturas. Se existirem microrganismos na amostra de teste inoculada dentro do frasco BactecTM da Becton & Dickinson vão metabolizar os substratos presentes no frasco, vai ocorrer a produção de CO₂. O CO₂ produzido reage com o material fluorescente que existe no fundo do frasco. O aumento da quantidade de CO₂ é monitorizado pelo instrumento da série fluorescente BactecTM. A análise da velocidade e da quantificação do aumento de CO₂ permite ao instrumento da série fluorescente, determinar se a leitura do frasco é positiva, ou seja se a amostra testada contém organismos viáveis. As amostras devem ser colocadas em tempo útil no laboratório

de microbiologia, para que desta forma, seja dissipado um crescimento microbiano anterior à colocação das hemoculturas dentro do aparelho Bactec. Este facto é de extrema importância, pois o aparelho assume sempre o valor de entrada como o zero de crescimento, se a hemocultura for colocada dentro do aparelho já com crescimento, este vai assumir esse valor como negativo.

1.12 Objetivos do trabalho

Este estudo teve como objetivo a caracterização da prevalência por idade e sexo das várias estirpes microbianas nos pacientes da UCI da Unidade Hospitalar do Alto Minho de Janeiro de 2005 a Dezembro de 2009 através da análise de sangue dos doentes internados nesta unidade hospitalar.

Simultaneamente, caracterizou-se o perfil de resistência destes microrganismos obtidos pelo antibiograma.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização do Contexto de Investigação

A Unidade Local de Saúde do Alto-Minho, EPE está inserida no Serviço Nacional de Saúde, com abrangência aos concelhos de: Melgaço, Monção, Valença, Paredes de Coura, V. N. de Cerveira, Caminha, Viana do Castelo, Ponte de Lima, Ponte da Barca e Arcos de Valdevez. A sua lotação actual é de 456 camas, sendo que: 162 pertencem ao departamento de Cirurgia, 180 ao departamento de Medicina, 82 ao departamento da Mulher e Criança, 24 ao departamento de Psiquiatria e Saúde Mental, 8 camas de Cuidados Intensivos (Unidade Polivalente) e 2 Blocos Operatórios.

De salientar que o distrito de Viana do Castelo é constituído por uma população residente de 250,951 mil habitantes estimada para 31 de Dezembro de 2008, dos quais 13,4% têm menos de 14 anos e 20,8% têm mais de 65 anos e uma densidade populacional de 113 hab/Km².

A UCI desta Unidade Hospitalar é constituída por recursos humanos especializados, equipamento adequado, com acesso à tecnologia evasiva avançada, destinada ao diagnóstico e terapêutica. Caracteriza-se como a unidade de maior consumo de antimicrobianos da Unidade Local de Saúde do Alto Minho, e entre os seus pacientes incluem-se portadores de patologias clínicas e cirúrgicas.

2.2 Caracterização da Amostragem

Para a presente investigação, foram seleccionadas dos pacientes da UCI, apenas hemoculturas positivas com um único agente microbiano.

As colheitas provenientes da UCI da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho foram relativas ao período compreendido entre Janeiro de 2005 e Dezembro de 2009.

2.3 Metodologia

Trata-se de um estudo retrospectivo no qual foram observados os resultados laboratoriais das hemoculturas de Janeiro do ano de 2005 até Dezembro de 2009 da UCI da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho. Este estudo foi submetido à apreciação do comité de ética desta Unidade local de Saúde.

A colheita de sangue dos pacientes foi realizada pelo técnico de saúde da UCI.

As hemoculturas foram incubadas no sistema automático de monitorização contínua Bactec-9240 da Becton & Dickinson.

Quando o sistema Bactec alerta para um crescimento positivo da hemocultura, esta é retirada do aparelho, desinfetada a parte superior da garrafa da hemocultura, prevenindo qualquer tipo de contaminação externa com a ajuda de uma seringa esterilizada, é retirado um volume definido de sangue. Realiza-se um esfregaço para posterior coloração de Gram, para observação da morfologia e coloração específica e, a amostra é semeada em meios de cultura contendo Agar Gelose de Sangue ou Chocolate, que é incubado a 35-37°C, a 5% de CO₂, de 24 a 48 horas, dependendo de se tratar ou não de uma estirpe fastidiosa. Completado o tempo de crescimento estipulado, é feita a leitura das placas e realizada a identificação e antibiograma do respectivo microrganismo, utilizando as galerias de identificação Api da Biomerieux e o sistema automatizado BD Phoenix™ da Beckton & Dickinson, para a identificação dos agentes infecciosos.

No suporte à identificação da espécie são realizados testes adicionais como no caso dos *Enterococcus spp*, em que as colónias do meio de cultura são inoculadas em meio de bile-esculina, e no caso dos *Staphylococcus spp* é realizado o teste de difusão em disco em Agar Mueller-Hinton para confirmar possíveis MRSA. O trabalho técnico foi realizado pelas Técnicas de Análises Clínicas do Serviço de Patologia Clínica, sendo a identificação, antibiograma automáticos e validação de resultados elaborada através do programa informático BD Epicenter™ da Becton & Dickinson e Clinidata XXI da Maxdata. O Serviço de Patologia Clínica pratica o controlo de qualidade interno proposto pelas empresas fornecedoras de material e participa em programas de qualidade externo internacional nas diversas áreas de microbiologia laboratorial.

2.4 Análise estatística

O número de pacientes da UCI da Unidade Hospitalar do Alto Minho não é amplo, deste modo, e de forma a adquirirmos uma amostra com uma contagem significativa de microrganismos, para posterior análise estatística, assumiu-se o agrupamento de microrganismos por grupos.

Os grupos microbiológicos considerados foram os seguintes:

-
- 1- *Streptococcus spp*
 - 2- Bacilos Gram negativo oxidase negativa
 - 3- Bacilos Gram negativo oxidase positiva
 - 4- *Staphylococcus coagulase negativa*

A amostra foi caracterizada, a nível descritivo, em termos de média, desvio padrão e limites no caso da variável quantitativa idade e em termos de frequências / percentagens no caso das restantes variáveis (qualitativas). De referir que a variável idade foi dividida em faixas etárias nomeadamente em idade inferior ou igual a 45 anos, idade entre 46-65 anos, idade entre os 66-75 anos e, idade superior ou igual a 76 anos. As variáveis quantitativas foram posteriormente analisadas através dos Testes U Mann-Whitney e Kruskal Wallis e as variáveis qualitativas foram analisadas através do Teste Qui-Quadrado. O nível de significância estatística considerado foi de $p < 0.05$ e os dados foram processados através do programa de estatística SPSS versão 17.0 para o Windows.

3. Resultados e Discussão

Através da análise da tabela 2, sem a aplicação dos critérios de exclusão, observa-se a presença nas hemoculturas desta unidade hospitalar de microrganismos potencialmente patogênicos que fazem parte da flora normal do paciente com 13 casos de *Streptococcus pneumoniae*, 11 casos de *Staphylococcus aureus*, 8 casos de *Escherichia coli*. Foram encontradas bactérias de grande relevância médica, 13 casos de *Pseudomonas aeruginosa*, 7 casos de *Serratia marcescens*, 4 casos de *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae* e de *Acinetobacter baumannii*. As hemoculturas apresentaram um número reduzido de bacilos Gram- positivos, dentre os quais 1 caso de *Cellulomonas humilata* e de *Corynebacterium afermentans*.

Tabela 2 – Amostra base sem a aplicação dos critérios de exclusão.

Micróbio	N=186	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	2.2
<i>Acinetobacter baumannii / calcoaceticus complexo</i>	1	0.5
<i>Cellulomonas humilata</i>	1	0.5
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1.1
<i>Corynebacterium afermentans</i>	1	0.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	2.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	2.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	19	10.2
<i>Enterococcus faecium</i>	5	2.7
<i>Eschericia coli</i>	8	4.3
<i>Gemella morbillorum</i>	2	1.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1.1
<i>Klebsiella pneumoniae spp ozaenae</i>	1	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	4	2.2
<i>Kocuria varians</i>	1	0.5
<i>Micrococcus luteus</i>	4	2.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	7
<i>Serratia marcescens</i>	7	3.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	5.9
<i>Staphylococcus capitis</i>	5	2.7
<i>Staphylococcus capitis capitis</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus capitis spp ureolyticus</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	9	4.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	54	29
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	1.1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	23	12.4
<i>Staphylococcus hominis</i>	23	12.4
<i>Staphylococcus warneri</i>	13	7
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0.5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0.5
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13	7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	1.6

Excluíram-se da amostra os sujeitos que possuíam hemoculturas positivas com mais do que um tipo de microrganismo. Desta forma, da amostra inicial de 186 sujeitos com hemoculturas positivas, excluíram-se 61 sujeitos por possuírem marcadores em mais do que um grupo microbiológico, ou até mais do que um marcador dentro do mesmo grupo, isto é, por possuírem mais do que um tipo de microrganismos pertencentes ou não ao mesmo grupo microbiológico. Com esta metodologia procurou-se evitar o enviesamento de resultados proveniente do efeito conjunto de mais do que um marcador microbiológico.

Na tabela 3 estão os microrganismos que fazem parte dos grupos microbiológicos selecionados neste estudo.

Tabela 3 – Percentagem de microrganismos por grupo microbiológico.

Grupo microbiológico	N	%
<i>Streptococcus spp</i>	19	15.2%
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	4.8%
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0.8%
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0.8%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9	7.2%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	1.6%
Bacilos Gram negativo oxidase negativa	14	11.2%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	2.4%
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	2.4%
<i>Eschericia coli</i>	5	4%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.8%
<i>Serratia marcescens</i>	2	1.6%
Bacilos Gram negativos oxidase positiva	11	8.8%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2.4%
<i>Acinetobacter baumannii / calcoaceticus complexo</i>	1	0.8%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	5.6%
Staphylococcus coagulase negativa	81	64.8%
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	2.4%
<i>Staphylococcus capitis capitis</i>	6	4.8%
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	0.8%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	24.8%
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	1.6%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	11	8.8%
<i>Staphylococcus hominis</i>	15	12%
<i>Staphylococcus warneri</i>	7	5.6%

O grupo com um maior grau de prevalência no estudo, os *Staphylococcus* coagulase negativa, tem uma maior percentagem de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis*. O *Staphylococcus* coagulase negativo foi o grupo predominante de microrganismos, deste grupo os *Staphylococcus epidermidis* foram os que obtiveram maior taxa de prevalência, resultados que estão de acordo com Casey et al (2007).

O segundo grupo microbiológico de prevalência foi o *Streptococcus spp* que apresenta um número elevado de *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, dentro deste grupo o microrganismo com maior incidência foi o *Streptococcus pneumoniae* que de acordo com Allen, (2005) é um dos microrganismos que faz parte da flora normal do indivíduo saudável e que num estado de debilidade do paciente pode provocar doença.

Os bacilos Gram-negativos oxidase negativa têm uma maior percentagem dos microrganismos *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*; os bacilos Gram-negativos oxidase positiva apresentam um maior número de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Segundo Allen (2005) estas estirpes fazem parte do conjunto de microrganismos potencialmente patogénicos, associados a infeções na unidade hospitalar. A *Pseudomonas aeruginosa* e o *Acinetobacter baumannii* são estirpes relacionadas com um estado de debilidade do paciente, pois estão associados ao uso de ventilação mecânica e cateteres venosos centrais (Rizzo, 2005).

Na tabela 4 apresenta-se a caracterização da amostra base. No que se refere ao número de colheitas realizadas por estação do ano, verifica-se uma distribuição uniforme ($p=0.242$). Relativamente ao grupo microbiológico, nota-se uma maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa ($n=81$; 64.8%; $p=0.000$). De destacar a menor prevalência de Bacilos Gram negativo oxidase positiva que atingiu na amostra apenas 8.8% ($n=11$).

A mostra consecutiva é formada por 125 sujeitos dos quais 89 (71.2%) são do sexo masculino. A amostra apresenta uma idade média de 62.4 anos (DP=16.8) a variar entre os 18 e os 91 anos. Quando é analisada através de faixas etárias verifica-se uma distribuição heterogénea com os grupos entre os 46-65 ($n=44$) e com idade superior ou igual a 76 anos ($n=36$) a apresentar um número significativamente superior de sujeitos ($p=0.012$).

Tabela 4 – Caracterização geral da amostra por idade, sexo, estação do ano e grupo microbiológico.

	N =125	%	P
Idade n (média±DP)			
≤45 anos	21 (36.6±8.1)	16.8%	0.012
[46-65] anos	44 (54.8±6.3)	35.2%	
[66-75] anos	24 (70.2±2.7)	19.2%	
≥76 anos	36 (81.6±4.0)	36%	
Sexo			
1.Masculino	89	71.2%	0.000
2.Feminino	36	28.8%	
Estação do ano na colheita			
1.Inverno	30	24%	0.242
2.Primavera	24	19.2%	
3.Verão	40	32%	
4.Outono	31	24.8%	
Grupo microbiológico			
1. <i>Streptococcus spp</i>	19	15.2%	0.000
2.Bacilos Gram-negativo oxidase negativo	14	11.2%	
3.Bacilos Gram- negativo oxidase positivo	11	8.8%	
4. <i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	81	64.8%	

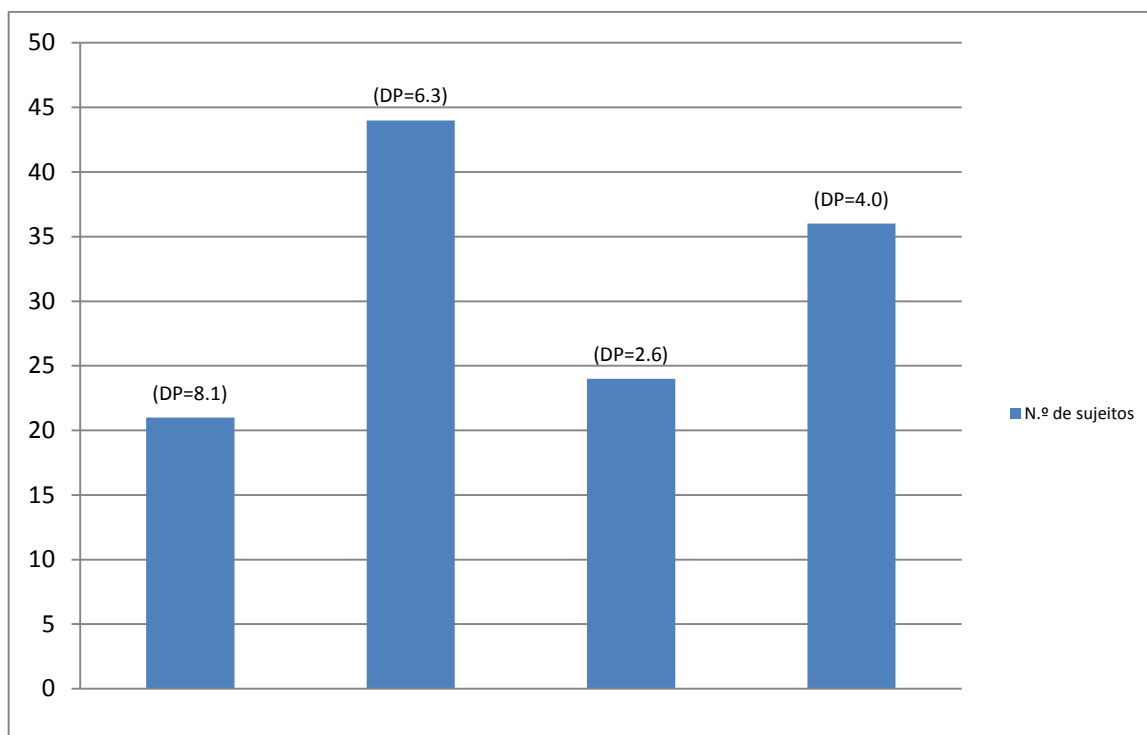


Figura 2 – Distribuição dos sujeitos pelas faixas etárias com indicação da média e desvio-padrão.

A figura 2 comprova o que foi referido no parágrafo anterior, o predomínio na amostra, em termos de faixas etárias situa-se no intervalo entre os 46 e 65 anos, com uma média de idade de pacientes de 54,8 anos. O segundo grupo com maior relevância na amostra situa-se acima dos 76 anos. Pacientes com idades inferiores a 45 anos são os que manifestam uma menor prevalência.

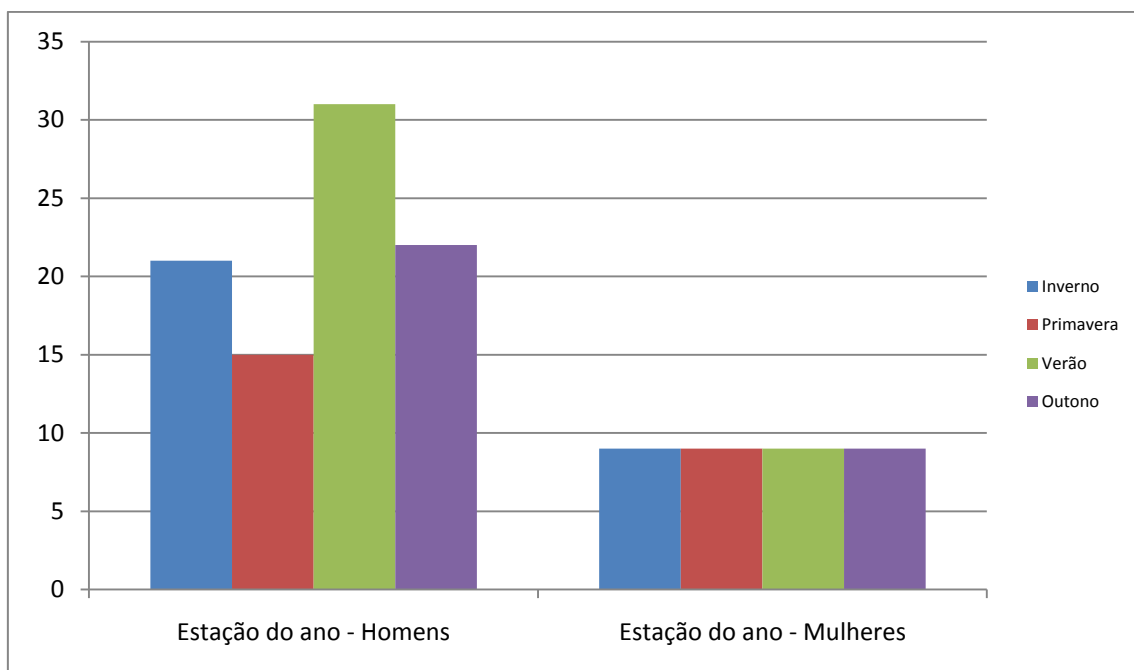


Figura 3 – Análise comparativa entre homens e mulheres no que se reporta à estação do ano na colheita.

Através da leitura da figura 3 verifica-se que enquanto existe uma distribuição uniforme do sexo feminino ao longo das várias estações do ano, no sexo masculino observa-se maior prevalência nos meses de Verão e Outono e uma menor prevalência na Primavera.

No período de tempo analisado, a incidência de pacientes na UCI do sexo masculino foi superior ao sexo feminino, contudo no que concerne à média de idades, os doentes do sexo feminino demonstram uma idade superior à do sexo masculino, 68.6 anos e 59.9 anos respetivamente, estes resultados estão de acordo com o estudo de Romo et al (2004), o qual refere que as hormonas sexuais podem estar associadas a uma melhor capacidade de resposta imunológica por parte do doente. Estes autores referem ainda que, numerosos estudos demonstraram que a resposta imunológica associada à sepsis pode ser regulada pela hormona sexual estrogénio. De acordo com os autores, o estrogénio ajuda as mulheres mais jovens a adquirirem uma resposta proinflatória com maior eficácia.

Já no que se refere ao grupo microbiológico, tabela 4, os homens e as mulheres revelam uma maior presença de *Staphylococcus* coagulase negativo com um número de 57 e 24 sujeitos respectivamente ($p=0.000$). Ao comparar-se o grupo microbiológico entre sexos, verifica-se que os homens apresentam um número significativamente superior de sujeitos com exceção dos Bacilos Gram negativo oxidase positiva que manifestam números similares entre grupos.

Tabela 5 – Caracterização da amostra por sexo H/M análise comparativa entre homens e mulheres.

	Homens n=89			Mulheres n=36			P (H/M)
	N	%	P	N	%	p	
Idade							
≤45 anos	18	14.4%	0.014	3	2.4%	0.046	0.001
[46-65] anos	35	28%		9	7.2%		0.000
[66-75] anos	15	12%		9	7.2%		0.221
≥76 anos	21	16.8%		15	12%		0.317
Estação do ano na colheita							
1.Inverno	21	16.8%	0.118	9	7.2%	1	0.028
2.Primavera	15	12%		9	7.2%		0.221
3.Verão	31	24.8%		9	7.2%		0.001
4.Outono	22	17.6%		9	7.2%		0.020
Grupo microbiológico							
1. <i>Streptococcus spp</i>	14	11.2%	0.000	5	4%	0.000	0.039
2.Bacilos Gram negativo oxidase negativo	9	7.2%		2	1.6%		0.035
3.Bacilos Gram negativo oxidase positivo	9	7.2%		5	45%		0.285
4. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	57	45.6%		24	19.2%		0.000

Quando se analisa a tabela 5, especificamente os grupos de acordo com o sexo e reportando-nos aos homens, formam um grupo de 89 sujeitos com idade média de 59.9 anos (DP=16.8). Já o grupo das mulheres é constituído por 36 sujeitos com idade média de 68.6 anos (DP=15.3) sendo significativamente mais velhas do que o grupo do sexo masculino (p=0.007). Relativamente á distribuição independente de homens e mulheres por faixas etárias constata-se uma distribuição heterogénea de sujeitos. No grupo dos homens verifica-se uma maior concentração de sujeitos entre os 46-65 anos (n=35; p=0.014). Já no

grupo das mulheres existe um maior número de sujeitos na faixa etária com idade superior ou igual aos 76 anos (n=15; p=0.046). Contudo, quando se compara o número de marcadores positivos entre o sexo masculino e feminino, verifica-se que os homens possuem uma amostra significativamente superior nas faixas etárias ≤ 45 anos (p=0.001) e 46-65 anos (p=0.000), contudo, não existem diferenças significativas nas faixas etárias 66-75 anos (p=0.056) e ≥ 76 anos (p=0.150).

Na análise da estação do ano de colheita, não se verificam diferenças significativas entre os homens (p= 0.118), acontecendo o mesmo no grupo das mulheres (p=1). Quando se comparam os géneros por estação do ano da colheita, constata-se que os homens apresentam um número significativamente superior de sujeitos com exceção da Primavera onde não se verificam diferenças significativas.

Ao analisar-se a amostra de acordo com o grupo microbiológico, tabela 6, nomeadamente a relação entre cada grupo microbiológico e a distribuição de sujeitos pelas faixas etárias, verifica-se uma distribuição uniforme com exceção do grupo microbiológico *Streptococcus spp* que apresenta um número significativamente superior de sujeitos com idade entre os 46-65 anos (n=10; p=0.024) e o grupo microbiológico Bacilos Gram negativo oxidase negativa que apresenta um número maior de sujeitos com idade superior ou igual a 76 anos (n=7; p=0.029).

Na leitura horizontal da figura especificamente a cada faixa etária, observa-se que na faixa etária ≤ 45 anos existe uma maior prevalência de *Staphylococcus coagulase negativa* (n=16; p=0.000). Na faixa etária entre os 46-65 anos constata-se uma maior prevalência de *Streptococcus spp* (n=10) e de *Staphylococcus coagulase negativa* (n=27) (p=0.000). Já nas faixas com idades compreendidas entre os 65-76 anos e ≥ 76 anos apenas se observa uma maior prevalência de *Staphylococcus coagulase negativa* (p=0.000).

Na análise da distribuição de cada grupo microbiológico pelas estações do ano de colheita, verificam-se distribuições uniformes de sujeitos (p \geq 0.112). No entanto, quando se analisa a distribuição dos grupos microbiológicos dentro de cada estação do ano na colheita, verifica-se um número significativamente superior de sujeitos com *Staphylococcus coagulase negativa* nas quatro estações do ano com os números de hemoculturas com este grupo microbiológico a variarem entre os 16-27 (p \leq 0.004).

Tabela 6 – Caracterização da amostra de acordo com o grupo microbiológico.

	Grupo Microbiológico								
	<i>Strept. Spp</i>	p	Bac.-oxid.-	p	Bac.-oxid.+	P	<i>Staph. Coag.-</i>	p	P
Idade por faixas etárias (n)									
≤45 anos	1		1		3		16		0.000
[46-65] anos	10	0.024	2	0.029	5	0.699	27	0.242	0.000
[66-75] anos	3		1		4		16		0.000
≥76 anos	5		7		2		22		0.000
Estação do ano na colheita (n)									
1.Inverno	5	0.606	2	0.147	4	0.112	19	0.457	0.000
2.Primavera	4		2		2		16		0.000
3.Verão	7		6		7		20		0.004
5.Outono	3		1		1		26		0.000

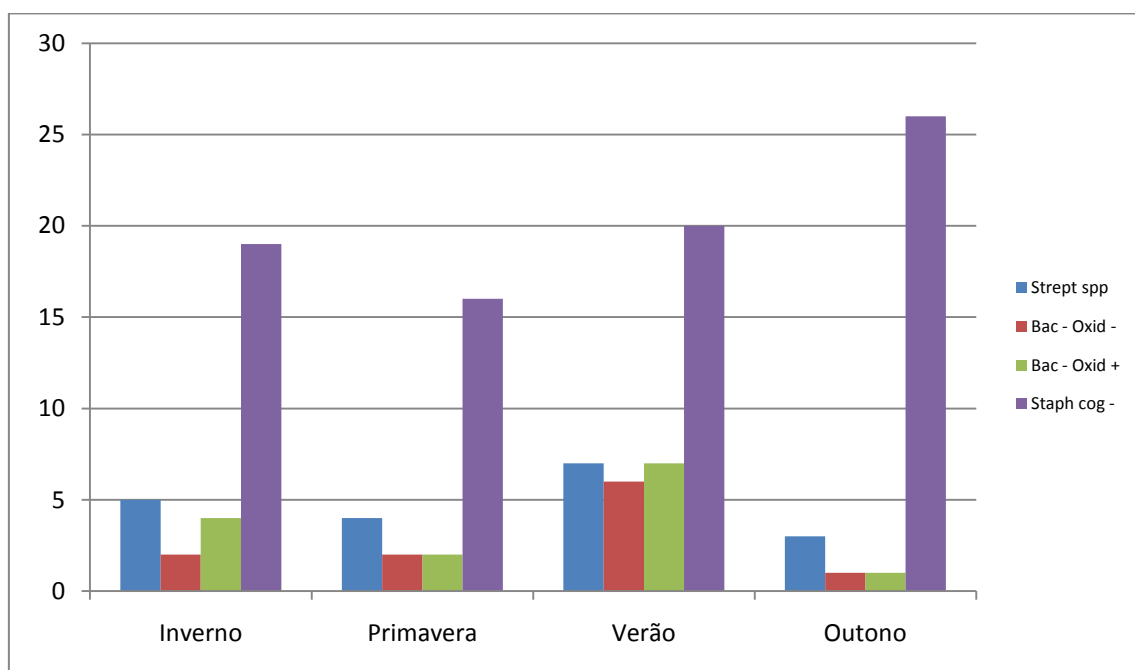


Figura 4 – Análise comparativa entre grupos microbiológicos de acordo com a estação do ano na colheita.

Pela análise da figura 4 constata-se mais uma vez que, o grande predomínio na nossa amostra é o *Staphylococcus* coagulase negativa nas quatro estações do ano. Tendo o seu pico máximo no Outono. Nos meses de Verão e Inverno a presença destes microrganismos é muito semelhante.

Os *Streptococcus spp* são o segundo grupo de microrganismos com maior prevalência em todas as estações do ano, exceto no Verão, no qual tem uma prevalência muito semelhante aos bacilos Gram-negativo oxidase positiva. Os bacilos Gram-negativos oxidase negativa são o grupo de microrganismos com uma menor prevalência em todos os meses do ano, salvo o Outono, no qual bacilos Gram-negativos oxidase negativa e os bacilos Gram-negativo oxidase positiva têm uma prevalência semelhante.

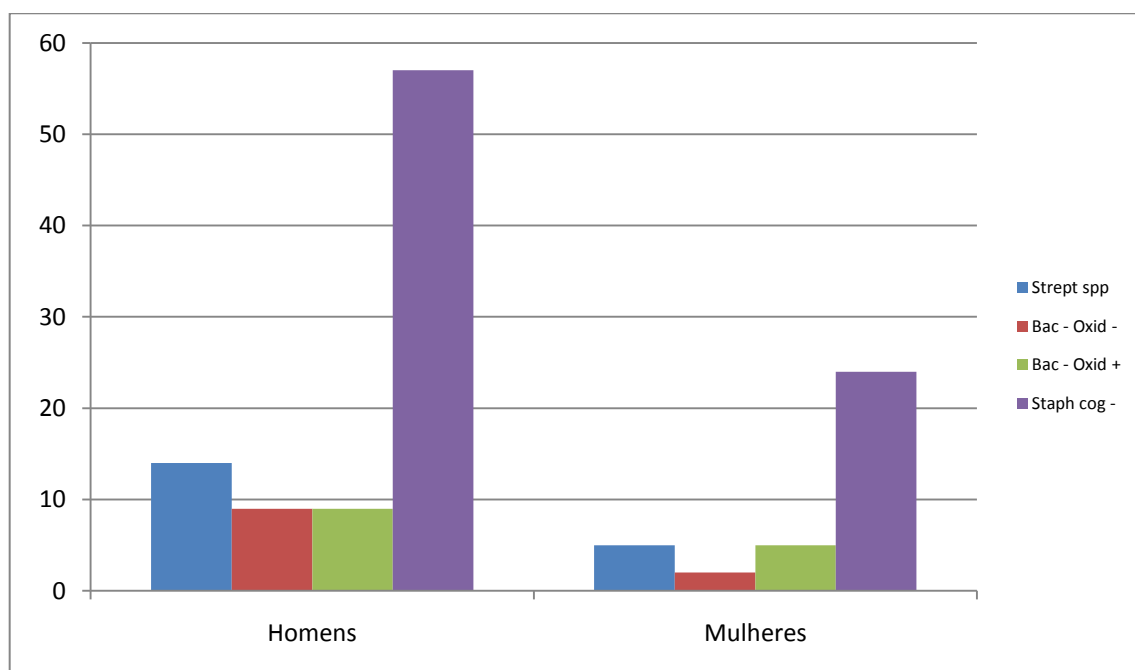


Figura 5 – Análise comparativa entre homens e mulheres no que se reporta aos grupos microbiológicos.

A figura 5 revela uma maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa em ambos sexos. Depois da grande família de *Staphylococcus* coagulase negativa nos homens encontramos os *Streptococcus spp*, e nas mulheres os *Streptococcus spp* e os bacilos Gram negativos oxidase positiva.

O estudo realizado deparou-se com algumas limitações, em particular o diminuto tamanho da amostra.

Recolheu-se informação na entrada do doente, sem ter análises intercalares e finais. A escolha do antibiótico dependeu de critérios médicos. No resultado dado ao clínico, indicou-se o tipo de antibiótico que poderia ser administrado. Mesmo não havendo retorno por parte do médico, de qual ou quais dos antimicrobianos foram escolhidos, no entanto considerou-se relevante o estudo informativo do perfil de suscetibilidade aos antibióticos nesta unidade hospitalar, que portanto foi analisada em termos de percentagem. As figuras seguintes mostram algumas das estirpes patogénicas com maior destaque como agentes etiológicos de IH's.

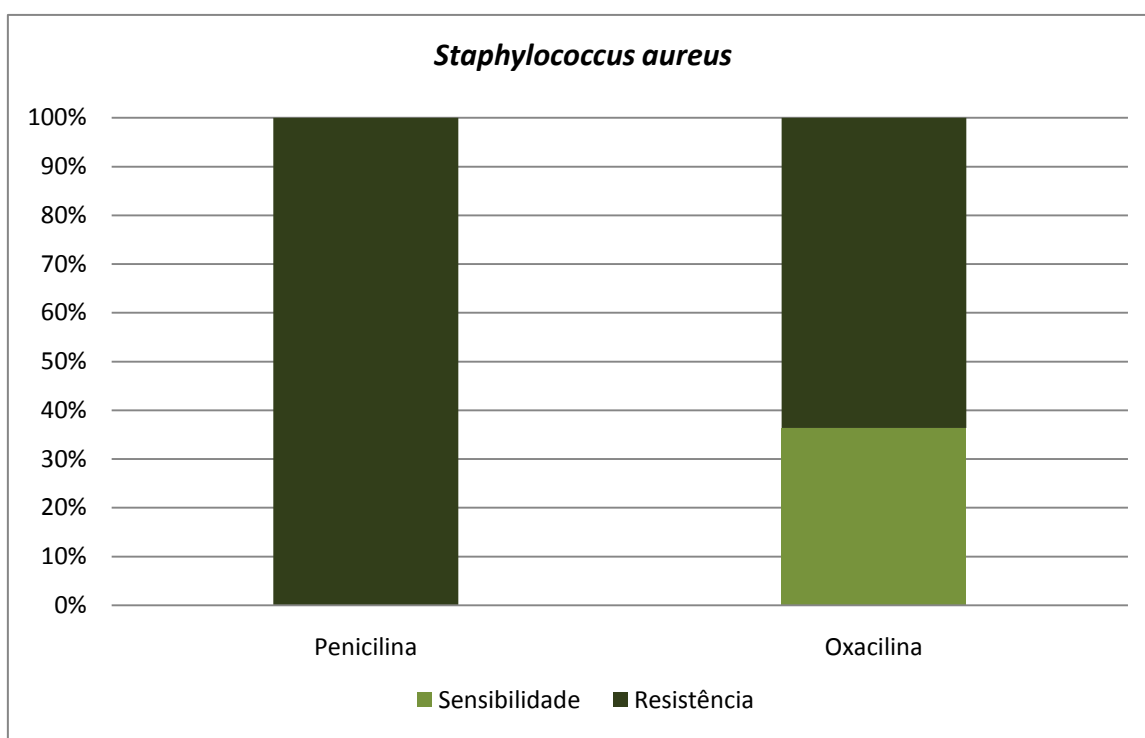


Figura 6 –*Staphylococcus aureus* sensíveis / resistentes à Penicilina e Oxacilina.

A partir da figura 6 podemos observar uma total resistência do *Staphylococcus aureus*, presente nesta Unidade de Saúde, à penicilina e uma elevada percentagem, mais de 60%, de estirpes são resistentes à metilicina.

Os *Staphylococcus aureus* estiveram também presentes na nossa amostra de hemoculturas, apenas tendo sido relatados 11 casos. As estirpes de *Staphylococcus aureus* presentes durante a realização deste estudo demonstraram ser β -lactamase de largo espetro,

e com uma elevada percentagem de resistência à meticilina. Estes resultados são semelhantes aos observados no grupo dos *Staphylococcus coagulase negativo*.

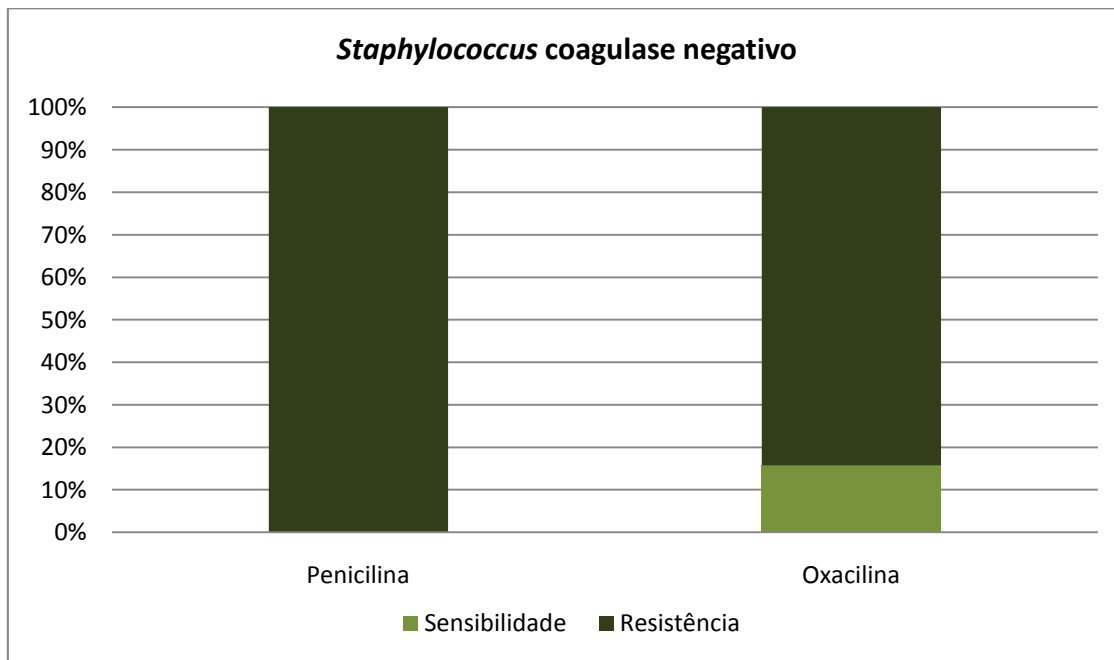


Figura 7 –*Staphylococcus coagulase* negativos sensíveis / resistentes à Penicilina e Oxacilina.

Em semelhança com os *Staphylococcus aureus* observamos uma resistência total dos *Staphylococcus coagulase negativo* à penicilina e mais de 80% de resistência à meticilina. Os *Staphylococcus coagulase negativo* desta amostra demonstraram-se ser resistentes à penicilina, além de possuírem β -lactamase de largo espectro, e com uma resistência bastante elevada, na ordem dos 80%, à meticilina, resultados que estão de acordo com pesquisa bibliográfica efetuada (Harris & Richards, 2006).

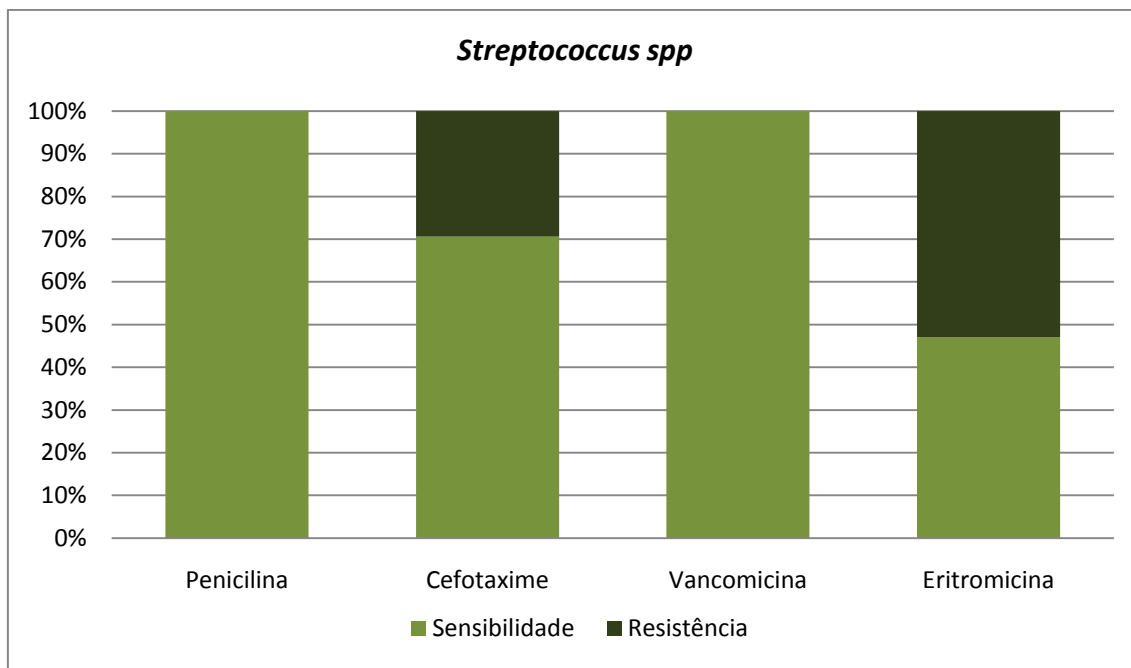


Figura 8 – Perfil de sensibilidade e resistência dos *Streptococcus spp.* a vários antibióticos

Este grupo de microrganismos revela uma sensibilidade total à penicilina e à vancomicina. A percentagem de estirpes resistentes ao cefotaxime é inferior a 30% e de estirpes resistentes à eritromicina é superior a 50%.

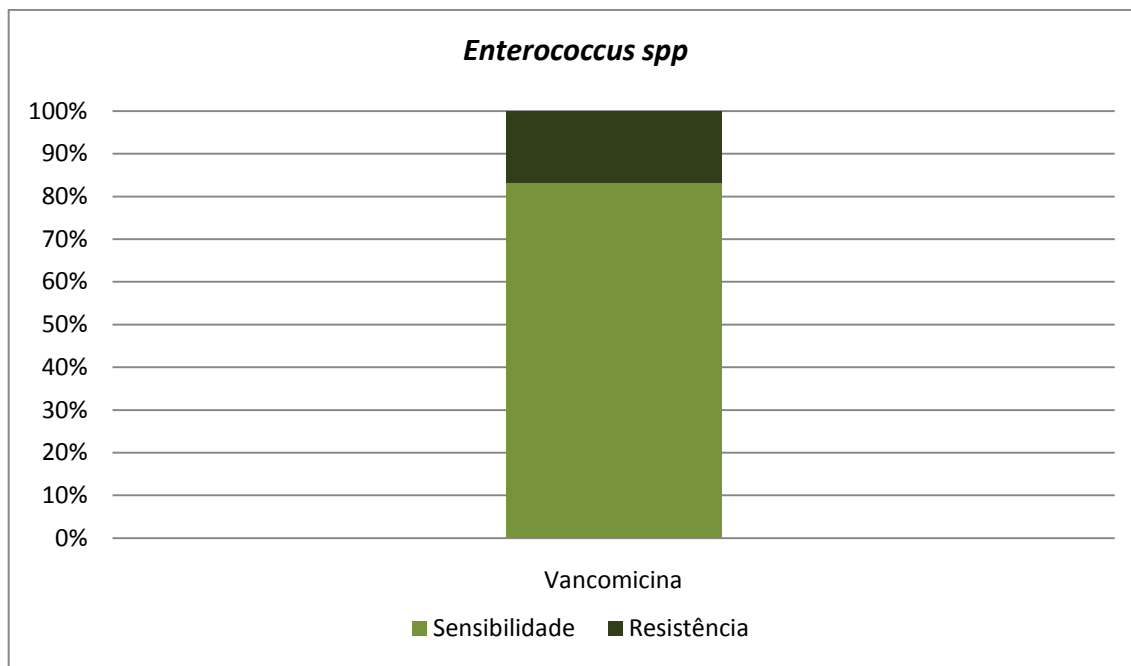


Figura 9 – Perfil de sensibilidade e resistência dos *Enterococcus spp.* à Vancomicina

Os *Enterococcus spp* apresentam uma resistência de aproximadamente 20% à vancomicina. Segundo Kim (2012) estas estirpes emergentes de VRE surgem através da utilização da vancomicina no tratamento de estirpes resistente à metilina.

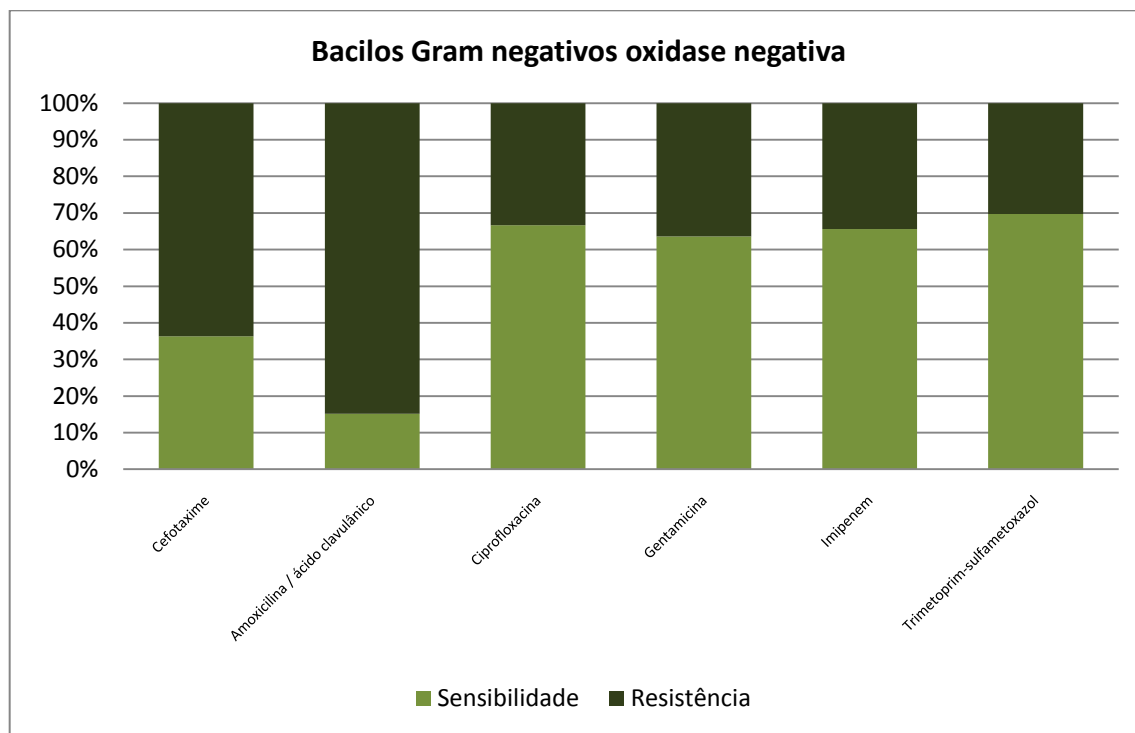


Figura 10 – Perfil de sensibilidade e resistência dos Bacilos Gram- negativos oxidase negativa a diferentes antibióticos.

A análise desta figura permite-nos visualizar uma elevada resistência por parte dos bacilos Gram-negativos oxidase negativa à amoxicilina/ácido clavulânico, aproximadamente 85%, e ao cefotaxime próximo dos 65%. Os restantes antibióticos adquiriram uma percentagem de resistência muito semelhante, na ordem dos 35%, e cerca de 30%, às quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenemos e ao trimetoprim-sulfametoxazol, resultados concordantes com os dados publicados (Tragante et al, 2008).

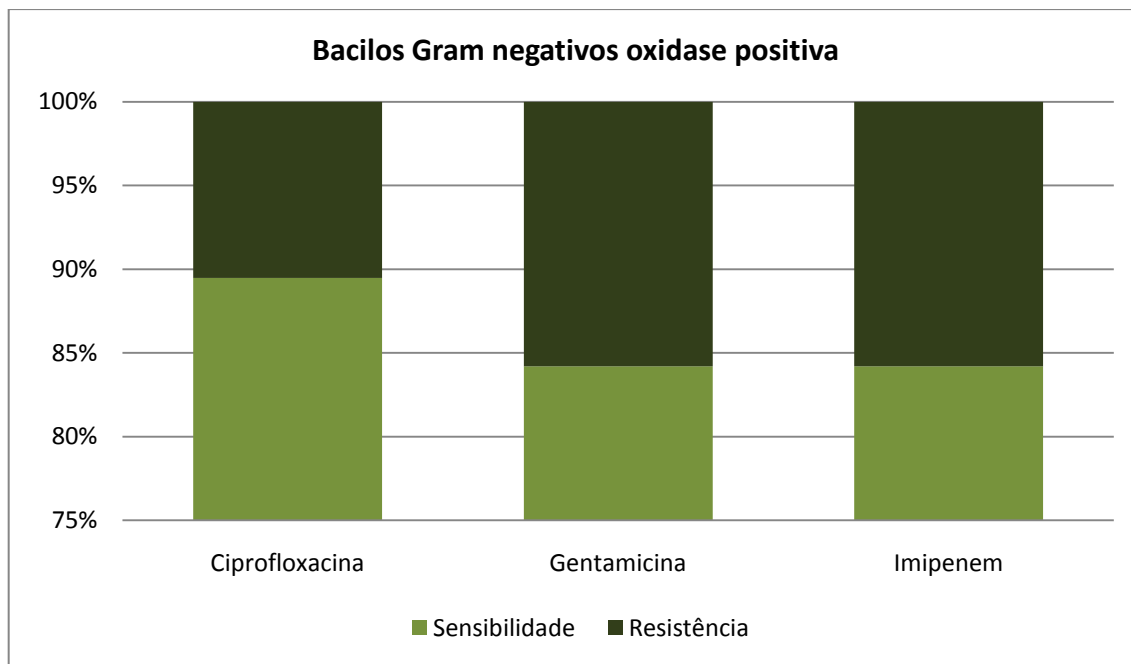


Figura 11 – Perfil de sensibilidade e resistência dos Bacilos Gram- negativos oxidase positiva a diferentes antibióticos.

Nesta figura quase 90% das estirpes de bacilos Gram-negativas oxidase positiva são sensíveis à ciprofloxacina; a percentagem sensibilidade à gentamicina e ao imipenem aproxima-se dos 85%. Este grupo demonstrou alguma resistência aos aminoglicosídeos e carbapenemos, cerca de 25%, e às quinolonas, nomeadamente à ciprofloxacina, cerca de 10%. Segundo Karabay et al (2012), o *Acinetobacter baumannii* pode sobreviver por longos períodos de tempo em condições ambientais inadequadas, podendo-se propagar rapidamente aos pacientes. De acordo com Kayabas et al (2008) a *Pseudomonas aeruginosa* é um agente nosocomial importante, e a UCI está implicada em transmissões horizontais particularmente nas áreas cirúrgicas.

De acordo com Curtis (2008), o rastreio dos pacientes na admissão hospitalar pode reduzir e prevenir futuras infeções nosocomiais.

Um número desproporcional de IHS adquiridas provêm da UCI, esta unidade pode atuar como uma fonte de disseminação de IHS, muitas das quais resistentes à maioria dos antibióticos (Allen, 2005).

Um estudo pan-europeu documenta uma elevada frequência de sepsis nos pacientes críticos da UCI, e uma estreita relação entre este fator e a taxa de mortalidade (Vincent et al, 2006).

O *Staphylococcus epidermidis*, segundo Harris & Richards (2006) está associado a IHS caracterizadas por uma resistência antimicrobiana muitas vezes superior à do *Staphylococcus aureus*, isto devido à capacidade que este microrganismo tem em aderir à pele e membranas mucosas do hospedeiro, através da produção de bacteriocinas, chamadas de lantibióticos, e à sua habilidade em formar uma camada fina de biofilme, o que provoca hemaglutinação e agregação bacteriana, que o protege do sistema imunitário do paciente.

É importante a deteção e o controlo da disseminação dos bacilos Gram-negativos oxidase negativa resistentes, pois o seu impacto na taxa de mortalidade é elevado (Tragante et al, 2008).

A pesquisa bibliográfica efectuada tornou-se fundamental para uma melhor e maior compreensão do problema das IHS, constituindo hoje um problema hospitalar e comunitário grave, que se tem vindo a exacerbar cada vez mais, ameaçando a saúde pública à escala transnacional, coloca assim, um conjunto de preocupações importantes (Rizzo, 2005). Desta forma, impõe-se a necessidade, de como refere Sequeira (2004) fazer um controlo à escala global, o que implica a tomada de consciência generalizada, o reconhecimento e estudo do problema, tendo o seu estudo de ser feito a partir de uma abordagem multidisciplinar.

Os dados publicados vêm ainda justificar a pertinência da investigação, pois a grande incidência de IHS por mecanismos de multiresistência, como observamos no desenvolvimento do trabalho, justifica a necessidade de capacitar os laboratórios de microbiologia, de forma a detetarem e comunicarem com eficácia e rapidez os resultados obtidos, para que atempadamente possam ser tomadas medidas de controlo adequadas (Allen, 2005).

No sentido dessa rapidez e eficácia torna-se importante a compreensão dos mecanismos de resistência e, para isso, é fundamental rever os mecanismos de acção dos antibióticos. No controlo e prevenção das infeções na UCI, segundo Allen, (2005) dever-se-ia realizar quando possível uma terapia de combinação de antibióticos, bem como o desenvolvimento de vacinas contra os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e

contra bacilos Gram-negativos patogénicos e fazer um rastreio a todos os profissionais de saúde que colaboram nas UCIs. A maior incidência de bactérias resistentes, encontra-se nas UCIs, em resultado do uso excessivo de antibióticos. Estes últimos, pela utilização abusiva de que são alvo, passaram da cura de algumas doenças difíceis para a origem de novos problemas.

De acordo com Serqueira, (2004) é interessante verificar que os antibióticos, que possibilitaram curar com facilidade determinadas doenças, tendo assim contribuído para a melhoria da saúde das populações, encontram-se hoje na origem de uma nova crise. Isto é, as doenças que anteriormente eram recuperadas com facilidade, rapidamente se tornam difíceis de tratar, em resultado da resistência dramática aos antibióticos. No seguimento do estudo deste autor, encontramos dados que indicam que a resistência microbiana se encontra presente desde o início do uso dos antibióticos, e ainda, que as primeiras estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes às penicilinas foram encontradas na década de 40, antes do uso generalizado das penicilinas. Os microrganismos adquirem resistência aos antibióticos por meio de: mecanismos de inativação enzimática, processo que ocorre quando se produzem enzimas capazes de inativar os antibióticos (betalactamases, clorocetiltransferase e enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos) e mecanismos de redução da permeabilidade da membrana celular da bactéria, dificultando assim, a passagem do antibiótico e também a alteração dos locais recetores onde se liga o antibiótico, (Randrianirina et al, 2009).

As IHS associadas aos cuidados de saúde afetam entre 5 a 10% dos doentes, em particular 15 a 50% na UCI, atualmente, e segundo dados da OMS 2005, 1,4 milhões de indivíduos sofrem de IACS em todo mundo, das quais podem ser prevenidas 20 a 30%, segundo dados do CDC, de entre os microrganismos que provocam IACS, 70% são resistentes a pelo menos um antibiótico (Schabrun & Chipchase, 2006).

Na Europa existem dados referentes a 5 milhões de IACS por ano, sendo que 50.000 são fatais e contribuem para a morte de 135.000 casos, nos Estados Unidos estão reportados 2 milhões de casos, dos quais 80.000 são fatais e contribuem para a morte do paciente (Bisaga et al, 2008).

Educar a população em geral e os profissionais de saúde são imperativos para deter a expansão da IH (Previsdomini, 2012). Aproximadamente um terço das infeções da UCI está associado a infeções cruzadas que se manifestam 5-7 dias após ao internamento nesta

unidade na qual o profissional de saúde pode ser o vetor (Macias & Leon, 2005). Este fato pode ser reduzido por medidas de controlo da infeção, que incluem a lavagem das mãos, adoção de barreiras universais de precaução, o uso de desinfetantes fenólicos na limpeza de superfícies, limpeza frequente e rígida dos equipamentos que estão em contato direto com o doente através do uso de álcool a 70%, mudanças na política de antibioterapia e uso de unidades de filtros HEPA (Carling et al, 2008).

4. Conclusões Gerais

Os resultados reunidos no presente trabalho permitiram caracterizar o perfil microbiológico e suscetibilidade aos antibióticos das hemoculturas da UCI da ULSAM. A amostra de pacientes submetidos às colheitas de sangue foi majoritariamente do sexo masculino (71.2%), com uma média de idades de 62.4 anos. Os grupos microbiológicos com maior prevalência foram o *Staphylococcus* coagulase negativo, dentro deste grupo o *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus hominis* apresentaram o maior número de casos. O outro grupo com maior prevalência foi o *Streptococcus spp* e dentro deste grupo as estirpes com maior número de casos foram o *Streptococcus pneumoniae* e o *Enterococcus faecalis*. Nos bacilos Gram-negativos o microrganismo com maior número de casos foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação à resistência observamos nos *Staphylococcus* coagulase negativos e *Staphylococcus aureus* uma resistência total à penicilina, enquanto os *Streptococcus spp* foram todos sensíveis a este antibiótico. Os bacilos Gram negativos oxidase negativa demonstraram uma maior percentagem de resistência aos aminoglicosídeos, carbapenemos e quinolonas em relação aos bacilos Gram negativos oxidase positiva.

O laboratório de microbiologia da ULSAM, face aos resultados obtidos, adquire um papel importante na deteção e identificação dos microrganismos e seu perfil de suscetibilidade aos antibióticos, bem como na comunicação atempada e eficaz dos resultados ao clínico, para que desta forma se consiga deter a propagação das IHS. Por outro lado, o clínico e os profissionais de saúde devem estar capacitados sobre a sua função no controlo e prevenção deste tipo de infeções.

Em conjunto com o laboratório de microbiologia, a Comissão de Controlo de Infeção deve continuar a incrementar e difundir medidas eficazes no controlo desta problemática.

5. Trabalhos Futuros

Existe um número significativo de publicações associadas aos elementos que compõem a cadeia epidemiológica da infecção. A vigilância epidemiológica é uma ferramenta importante que possibilita reescrever a realidade da prevalência de infecções nas Unidades Hospitalares, deste modo, permite planejar ações frente aos fatores que possam desencadear risco para a saúde. Desta forma, considero pertinente o estudo do rastreio séptico dos pacientes nas unidades mais críticas da ULSAM, na admissão na Urgência desta Unidade Hospitalar e em serviços como a UCI e os Cuidados Intermédios. Outro estudo relevante nesta linha de orientação seria o perfil microbiológico das amostras de ar da ULSAM.

Face aos procedimentos invasivos que os pacientes das Unidades Cirúrgicas são submetidos destaco a pertinência do estudo do perfil microbiológico e resistência bacteriana nas infecções de feridas cirúrgicas nas unidades de Cirurgia, Ortopedia, Ginecologia e Obstetrícia das unidades de internamento da ULSAM; defendo também a investigação de quais os agentes infecciosos e o seu grau de suscetibilidade aos antibióticos nas feridas cirúrgicas abdominais na unidade de Cirurgia.

A Diabetes é uma doença que predispõem o paciente a um risco de infecção, o estudo do perfil microbiológico e de suscetibilidade aos antibióticos das infecções associadas surge como um desafio para esta Unidade Hospitalar.

6. Referências Bibliográficas

[1] Acuña, M., 2011. Hemocultivos en el diagnóstico microbiológico de enfermedades infecciosas: procedimientos, utilidad y aislamientos más ferquentes, Programa de Formación Continuada a Distancia 2011, **5**: 1-18.

[2] Allen, S., 2005. Prevention and control of infection in the ICU. *Current Anaesthesia & Critical Care*, **70**: 328-334.

[3] Bartley, J. M. e Olmsted, R. N., 2008. Reservoirs of Pathogens Causing Health Care-Associated Infections in the 21st Century: Is Renewed Attention to Inanimate Surfaces Warranted? *Clinical Microbiology Newsletter*, **30**: 113-117.

[4] Bisaga, A., Paquette, K., Sabatini, L. e Lovell, E.O., 2008. A Prevalence Study of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Emergency Department Health Care Workers, *Annals of Emergency Medicine*, **52**: 525-528.

[5] Boyce, J.M., 2007. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection, *American Journal of Hospital Infection*, **65**: 50-54.

[6] Brady, R.R., Verran, J., Damani, N.N. e Gibb, A.P., 2009. Review of mobile communication devices as potential reservoirs of nosocomial pathogens, *American Journal of Hospital Infection*, **71**: 295-300.

[7] Cabral, A.V., Poveda, V.B. 2008. Perfil Microbiológico e Resistência Bacteriana em Unidade de Tratamento Intensivo, *Revista de Enfermagem UFPE On Line*, São Paulo, Brasil, **2**: 312-317.

[8] Carrico, R. M., Rebmann, T., English, J. 2008. Infection prevention and control competencies for hospital-based health care personnel, *American Journal of Hospital Infection*, **36**, 691-701.

-
- [9] Carling, P.C., Beheren, S.V., Kim, P., e outros, 2008. Intensive care unit environmental cleaning: an evaluation in sixteen hospitals using a novel assessment tool, *American Journal of Hospital Infection*, **68**: 30-44.
- [10] Casey, A.L., Lambert, P.A. e Elliott, T.S.J., 2007. Staphylococci, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29**, Suppl. 3, S23-S32.
- [11] Crespo, M.P., Woodford, N., Sinclair, A., Kaufmann, M.E., Turton, J., Glover, J. 2004. Surto de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenem produzindo VIM-8, uma nova metalo-lactamase em um Centro Terciário em Cali, Colômbia, **2**: 377-378.
- [12] Curtis, L.T., 2008. Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions, *Journal of Hospital Infection*, **69**: 204-219.
- [13] Dupont, H., 2007. The empiric treatment of nosocomial intra-abdominal infections, *International Journal of Infectious Diseases*, **11**: S1-S6.
- [14] Eggimann, P., Sax, H, Pittet, D., 2004. Catheter-related infections, *Microbes and Infection*, **6**: 1033-1042.
- [15] Endereço: <http://www.earss.rivm.nl> [15 Março 2009]. [86] European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), 2007. "EARSS Annual report 2007".
- [16] Forbes, B.A., Sahm, D.F, e Weissepeld 2001. A.S. *Diagnóstico Microbiology*. Tenth edition. Mosby: 283- 400.
- [17] Furtado, G.H., Martins, S.T. e Coutinho, A.P. 2005. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil, *Revista de Saúde Pública*, **39**: 41-46.
- [18] Freitas, J.M., Amorim, A. e Miguel, S. 2002. *Staplylococcus* resistente à meticilina, *Postgraduate Medicine (edição Portuguesa)*, **18**: 52-53.

-
- [19] Gould, M., 2008. Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**: 1-9.
- [20] Green, D., Wigglesworth, N., Keegan, T., Wilcox, M.H., 2006. Does hospital cleanliness correlate with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia rates?, *Journal of Hospital Infection*, **64**: 184-186.
- [21] Guinan, J.L., McGuckin, M., Shubin, A. E Tighe, J., 2005. A descriptive review of malpractice claims for health care-acquired infections in Philadelphia, *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, **33**, n.º5, 310-312.
- [22] Haddadin, A. S., Fappiano, S. A., Lipsett, P. A., 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit, *Postgrad Medical Journal* 2002, **78**, 385-392.
- [23] Hall, M.J., Williams, S.N., DeFrances C.J., Golosinskiy A., 2011. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals, *National Center for Health Statistics* , **62**: 1-8.
- [24] Hansen, D., Blahout, B., Benner, D. e Popp, W., 2008. Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area, *Journal os Hospital Infection*, **70**: 259-264.
- [25] Harbarth, S., Sax, H. e Gastmeier, P., 2003. The preventable proportion os nosocomial infections: an overview of published reports, *Journal os Hospital Infection*, **54**: 258-266.
- [26] Harris, L.G. e Richards, R.G., 2006. Staphylococci and implant surfaces: a review, *Injury, Intensive Care Injured*, **37**: S3-S14.

-
- [27] Karabay, O., Yahyaoğlu, M., Oğütlü, A., Sandıkçı, O., Tuna, N., Ceylan, S., 2012. Factors Associated with Mortality in *Acinetobacter baumannii* Infected Intensive Care Unit Patients. *Mikrobiyol Bul, Turkish*, **46**: 335-337.
- [28] Kim, Y.J., Kim, S.I., Kim, Y.R., Lee, J.Y., Park, Y.J., Kang, M.W., 2012. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci infection and mortality in colonized patients on intensive care unit admission, *American Journal of Infection Control*, **6**: 304-308.
- [29] Lankford, M.G., Collins, S., 2005. Assesment os materials commonly utilizd in health care: Implications for bacterial survival and transmission, *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, **34**: 5.
- [30] Leth, R.A. e Moller, J.K., 2006. Surveillance of hospital-acquired infections based on electronic hospital resistries, *American Journal of Hospital Infection*, **62**: 71-79.
- [31] Loveday, H.P., Pellowe, C.M., Jones, S.R.L.J. e Pratt, R.J., 2006. A systematic review of the evidence for interventions for the preservation and control of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA working Party (Subgroup A), *American Journal of Hospital Infection*, **63S**: S45-S70.
- [32] Macias, A.E e Leon, S.P., 2005. Infection Control: Old Problems and New Challenges, *Archives of Medical Research*, **36**: 637-645.
- [33] Menezes, E.A., Silveira, L.A. e Cunha, F.A. 2003. Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza, *Online Brazilian Journal of Nursing, Brasil*, **34**: 177-180.
- [34] Merle, V., Tavolacci, M.P., Moreau, A., Dubreuil, N., Dollois, B., e outros, 2007. What factors influence healthcare professionals' opinion and attitude regarding information for patients about hospital infection?, *American Journal of Hospital Infection*, **66**: 269-274.

-
- [35] Oldfield, M.M., El-Masri, M., Fx-Wasylyshyn, S.M., 2009. Examining the association between chest tube-related factors and the risk of developing healthcare-associated infections in the ICU of a community hospital: A retrospective case-control study, *Intensive and Critical Care Nursing*, **25**: 38-44.
- [36] Oliveira. 2006. Infecções Hospitalares e Resistência Microbiana em Unidade de Cuidados Intensivos de um Hospital Universitário. *Online Brazilian Journal of Nursing, Brasil*, **5**: 30-34.
- [37] Paez, J.I.G, Costa, S.F., 2008. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review, *American Journal of Hospital Infection*, **70**: 101-108.
- [38] Pearman, J.W., 2006. 2004 Lowbury Lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci – from disaster to ongoing control, *American Journal of Hospital Infection*, **63**: 14-26.
- [39] Pinheiro, R.L. e Dutschmann, L. 1995. As quinolonas e a resistência bacteriana. *Revista Medicina Interna*, **2**: 262-263.
- [40] Previsdomini, M., Gini, M., Cerutti, B., Dolina, M., Perren, A., 2012. Predictors of positive blood cultures in critically ill patients: a retrospective evaluation, *Croatian Medical Journal*, **53**: 30-39.
- [41] Randrianirina, F., Vedy, S., Rakotovao, D., Ramarokoto, C.-E., Ratsitohaina, H., Carod, J.F., Ratsima, E., Morillon, M., Talarmin, A. 2009. Role of contaminated aspiration tubes in nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-2 and CTX-M-15 extended-spectrum B-lactamases, *American Journal of Hospital Infection*, **72**: 23-29.
- [42] Rizzo, M., 2005. Striving to eliminate catheter-related bloodstream infections: A literature review of evidence-based strategies, *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, **24**: 214-225.

-
- [43] Romo, H., Amaral, A.C., Vincent, J.L., 2004. Effect of Patient Sex on Intensive Care Unit Survival FREE, Arch Intern Med. 2004, American Medical Association, **164**: 61-65.
- [44] Rubinstein, E., 2008. *Staphylococcus aureus* bacteraemia with known sources, International Journal of Antimicrobial Agents, **32**, S18-S22.
- [45] Schabrun, S. e Chipchase, L., 2006. Healthcare equipment as a source of nosocomial infection: a systematic review, Journal of Hospital Infection, **63**: 239-245.
- [46] Sequeira, C. 2004. Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. Serviços Farmacêuticos dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra – Portugal, **14**: 45-68.
- [47] Sherlock, O., O’Connell, N., Creamer, E. E Humphreys, H., 2009. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness, Journal of Hospital Infection, **72**: 140-146.
- [48] Silva, C.M., Sena, K.X. e Chiappeta, A.A. 2006. Incidência Bacteriana em Hemoculturas. NewsLab, **77**: 132-144.
- [49] Sousa, J.C. 2005. Manual de Antibióticos e Antibacterianos. Edição Universidade Fernando Pessoa – Porto, 23-63.
- [50] Souza, L.B., Figueiredo, B.B. 2008. Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá, **40**: 31-34.
- [51] Stamilio, C., Shuey, J., Waters, M., Hnatuck, P., Tkatch, L.. Healthcare-acquired infection rates in a long-term acute care hospital: A 3-year study, American Journal of Hospital Infection, **33**: 5.

[52] Struelens, M., Denis, O. e Villalobos H.R., 2004. Microbiology os nosocomial infctions: progress and challenges, *Microbes and Infection*, **6**: 1043-1048.

[53] Tragante, C.R., Ceccon, M.E., Falcão, M.C., Seiti, M., Sakita, N. e Vieira, R.A. 2008. Prevalência de sepsis por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal, *Revista Paulistana Pediatria*, **26**: 59-63.

[54] Traumann, M., Lepper, P. M., e Haller, M., 2005. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the envolving role of water outlets as a reservoir of the organism, *American Journal of Hospital Infection* , **33**, S41-S49.

[55] Tsai, W., Chen, C., Ko, W., Pan, S., 2006. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in burn patients, *Burns*, **32**: 155-158.

[56] Vincent, J.L., Sakr, Y., Sprung, C.L., Ranieri, V.M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.R., Payen, D., 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators*, Elsevier, **34**: 344-353.

[57] Yakupogullari, Y., Otlu, B., e outros, 2006. Investigation of a nosocomial outbreak by alginate-producing pan-antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *American Journal of Hospital Infection* , **36**: e15-e18.