

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Ana Cristina Pereira Alves dos Reis

Contributos para o desenvolvimento de fagoterapias para infeções
hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica de Professor Doutor Ruben Fernandes (Ciências Químicas e das Biomoléculas), Professora Pilar Baylina Machado (Gestão em Saúde) e Dr. Ricardo Ferraz (Ciências Químicas e das Biomoléculas).

Setembro 2011

"Assim como existe uma forma saudável de definir e viver a doença, existe um desafio constante para manter e representar positivamente o estado de saúde".

(Bolander,1998)

TÍTULO: Contributos para o desenvolvimento de fagoterapias para infecções hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

RUNNING TITTLE: Fagoterapias para infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

RESUMO

As infecções hospitalares podem ser evitadas pelo controlo de determinados factores inerentes aos profissionais, material, ambiente. Neste momento, existe legislação própria de forma a regulamentar procedimentos que evitam a propagação da infecção e/ou dos agentes que a causam. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa oportunista responsável por grande parte das infecções hospitalares. Pelo facto de ser oportunista é mais frequente em pacientes imunocomprometidos, sujeitos a transplantes, intervenções cirúrgicas, entre outros. Em suma, esta tese contribui para a compreensão da biologia da *P. aeruginosa*, tratamento antibacteriano e sua resistência, bem como compreender a influência do estado metabólico dos indivíduos na infecção. Este estudo teve como objectivo compreender os factores de resistência manifestados pela *P.aeruginosa* no sentido de desenvolver alternativas terapêuticas para este agente. Numa primeira fase foram caracterizados 72 isolados hospitalares de *P. aeruginosa* e 91,67% manifestou resistência a mais do que 3 classes de Antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: *Pseudomonas aeruginosa*; resistência a antibióticos; fagoterapia; infecção hospitalar.

RUNNING TITTLE: Phagetherapies for infections caused by multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Summary

The hospital infections can be prevented by controlling some factors related with staff, material, and environment. At this moment the existing legislation regulates procedures that prevent the propagation of the infection and/or of the agents that causes it. The *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative opportunistic responsible for the most of the hospital infections. Because it is opportunistic it is more frequent in immunocompromised patients, submitted to transplants, surgical interventions. In short, this thesis has contributed for the understanding of the biology of *P. aeruginosa*, antibacterial treatment and its resistance to this treatment by using efflux bombs, and so as establishing associations with others factors, such as biochemical. This study has the objective to understand the resistance factors used by the *P. aeruginosa* in order to develop alternative therapies for this agent. Initially, 72 hospitalar isolated were characterized and 91,67% have revealed more than 3 classes of Antimicrobians.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; antibacterial resistance; phagetherapy; hospitalar infection.

Índice

RESUMO	3
Summary	4
Abreviaturas	7
Listagem de antibacterianos	9
I. Introdução	11
1.1. Patogenicidade	12
1.1.1. Sistemas de Efluxo	13
1.1.1. Enzimas inativadoras de Aminoglicosídeos	14
1.1.2. Produção de β -lactâmicos.....	15
1.2. Infecção	15
1.3. Controlo.....	16
1.3.1. Antibioterapia.....	17
1.4. Novas terapêuticas.....	20
1.4.1. Vacinação.....	20
1.4.2. Fagoterapia.....	21
1.4.3. Nanotecnologia.....	22
1.5. Objectivos	23
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Instrumentos e Químicos.....	26
2.1.1. Instrumentos	26
2.1.2. Químicos e <i>Kits</i>	26
2.1.3. Bactéria e Plasmídeo	26
2.2. Meios e Aditivos dos Meios.....	26
2.2.1. Meio de Crescimento	26
2.2.2. Aditivos dos Meios.....	27
2.3. Preparação de DNA bacteriano	27
2.4. Técnicas Microbiológicas	27
2.4.1. Esterilização	27
2.4.2. Condições Gerais de Crescimento.....	27
2.4.3. Armazenamento da Estirpe Bacteriana	28
2.4.4. Transformação bacteriana	28
2.4.5. Teste da Nitrocefina	29

2.4.6.	Reacção PCR.....	29
2.4.7.	Preparação do Gel de electroforese	29
2.5.	População	30
2.5.1.	Métodos Estatísticos.....	30
3.	Resultados e Discussão	33
3.1.	Resultados Estatísticos	34
3.2.	Resultados Laboratoriais	47
3.2.1.	Transformação bacteriana	47
3.2.2.	Teste da Nitrocefina	47
3.2.3.	Reacção PCR.....	48
4.	Discussão /Conclusão.....	51
5.	Perpectivas Futuras	55
6.	Bibliografia	59

Abreviaturas

GOD – glicose oxidase

LPS – lipopolissacarídeo

PCR – polimerase chain reaction

PrCR - Proteína C reactiva

POD – peroxidase

Listagem de antibacterianos

Antibacterianos β-lactâmicos	Classes
Amoxicilina + ácido clavulânico	Penicilinas
Ampicilina	
Ticarcilina	
Piperacilina	
Cefalotina (1. ^a geração)	Cefalosporinas
Cefpodoxima (2. ^a geração)	
Cefuroxima (2. ^a geração)	
Cefoxitina (2. ^a geração)	
Cefotaxima (3. ^a geração)	
Ceftazidima (3. ^a geração)	
Cefepima (4. ^a geração)	
Aztreonam	Monobactâmicos
Meropenem	Carbapenemos
Imipenem	
Outros Antibacterianos	Classes
Levofloxacina	Quinolonas
Pefloxacina	
Ciprofloxacina	
Amicacina	Aminoglicosídeos
Gentamicina	
Tobramicina	
Isepamicina	
Nitrofurantoína	Sulfonamidas
Tigeciclina	Tetraciclinas
Minociclina	
Colistina	Polimixinas

I. Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia e baciliforme. É um agente patogénico oportunista, e quando associado à sua resistência inata a diversos antibacterianos e antissépticos tornam-na uma causa importante de infecções hospitalares, pertencendo aos 5 patógenos mais comuns em contexto hospitalar. A incidência de infecções a nível hospitalar exerce um impacto considerável sobre os quadros de mortalidade e morbidade (Lo et al. 2009).

1.1. Patogenicidade

A *P. aeruginosa* está relacionada com muitas infecções e doenças em humanos maioritariamente em pacientes com o sistema imunológico comprometido. Pode causar infecções no tracto respiratório, urinário, no ouvido, olho e queimaduras. As infecções respiratórias causadas por *P. aeruginosa* estão associadas à fibrose cística causando a perda progressiva do funcionamento pulmonar até à sua total ineficiência (Tsakris et al.2009; Onguru et al. 2008; Hirsch et Tam 2011; Baumann et al 2009).

Os mecanismos de resistência a antibacterianos (figura 1) são vários e incluem a aquisição de genes de resistência através de plasmídeos ou transposões que codificam enzimas capazes de alterar quimicamente o antibacteriano, a aquisição de genes de resistência codificadores de receptores alvo de antibacterianos alterando-os ou a aquisição de bombas de efluxo que transportam os antibacterianos para o exterior celular (Tam et al. 2010).

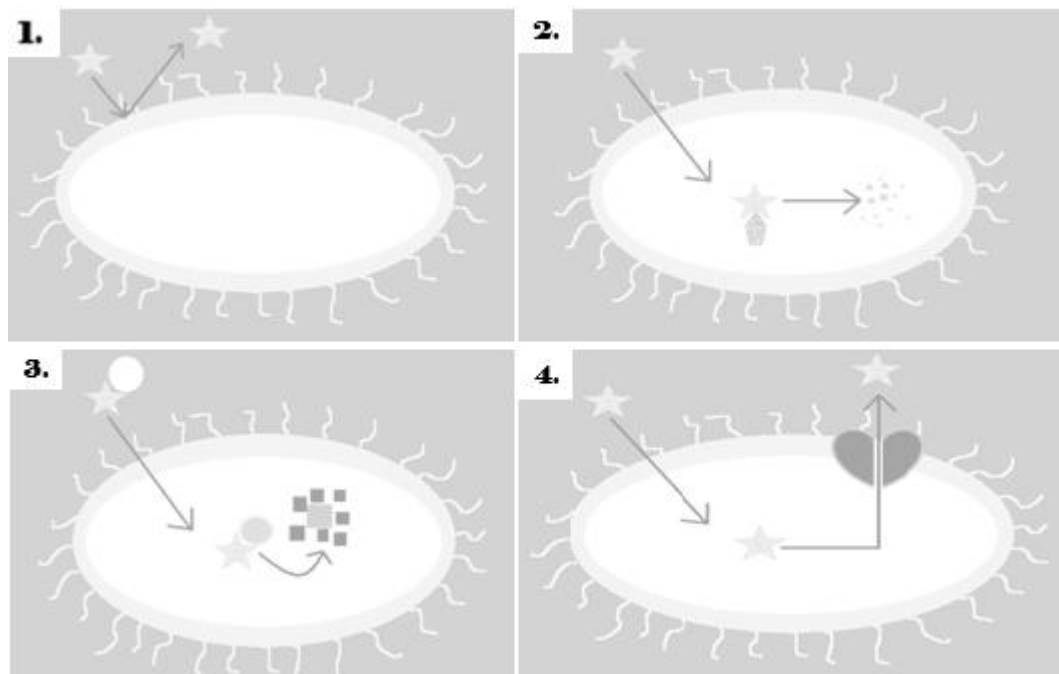


Figura 1 - Mecanismos de Resistência: 1. Alteração da permeabilidade, 2. Destruição enzimática, 3. Alteração do local de acção e 4. Bomba de efluxo. As estrelas representam os antibacterianos, as setas o movimento do antibacteriano, o coração representa a bomba de efluxo, os quadrados os receptores do antibacteriano modificados e os círculos a forma que os receptores do antibacterianos deveriam apresentar.

A *P. aeruginosa* apresenta diversos dos mecanismos de resistência a antibacterianos mencionados. Os mecanismos mais relevantes são a diminuição da permeabilidade da membrana externa, a presença de bombas de efluxo, a bicamada assimétrica na membrana externa, a produção de enzimas que inativam aminoglicosídeos e a produção de β -lactamases (Lauretti et al. 1999; Struble et Gill 2009; Tam et al. 2010).

Para além da sua elevada versatilidade a adquirir nutrientes e de surgir em diferentes ambientes, a *P. aeruginosa* é também conhecida por ser um agente patogénico oportunista para plantas, animais e humanos apresentando o mesmo espectro de factores de virulência em todos os hospedeiros (Rahme et al., 1995).

1.1.1. Sistemas de Efluxo

A *P. aeruginosa* expressa cinco sistemas de bombas de efluxo diferentes (tabela 1) os quais promovem resistência a vários fármacos pela hiperexpressão de genes de efluxo, tais como *MexAB-OprM* e *MexXY-OprM* (Piddock, 2006; Poole, 2001). Para além destes, dois sistemas de efluxo adicionais, *MexCD-OprJ* e *MexEF-OprN*, promovem resistência adquirida resultante de uma hiperexpressão mutacional dos genes de efluxo (Poole, 2001). Actualmente sabe-se que esta resistência resulta da sinergia entre a impermeabilidade da membrana externa e as bombas de efluxo cromossomicamente codificadas do tipo RND-MFP-OMF (Poole, 2001; Fraud et Poole, 2010).

Para além dos antibacterianos, estas bombas de efluxo (ver figura 2) exportam corantes, detergentes, inibidores, desinfetantes, solventes orgânicos, entre outras substâncias (Poole, 2001).

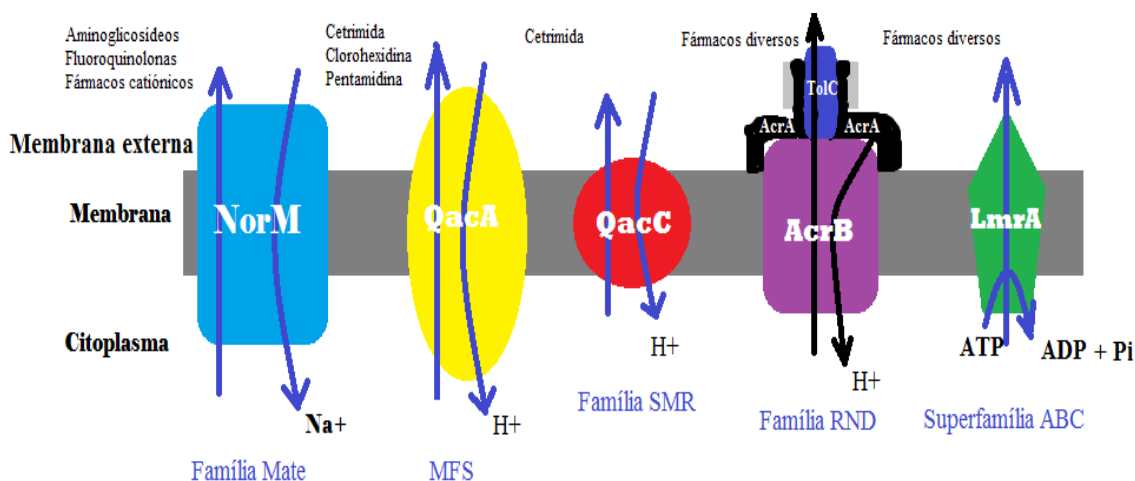


Figura 2 – Diagrama comparativo das cinco famílias de bombas de efluxo.

Estas bombas de efluxo pertencem à família *resistance nodulation division* (RND) e apresentam um sistema tripartido. São conduzidas pela força motora de um protão e consiste numa proteína de transporte localizada na membrana interna, uma proteína membrana externa e

uma proteína de fusão membranar localizada no periplasma (Pidcock, 2006; Poole, 2001; Fraud et Poole, 2010).

Está demonstrado que o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* com antibacterianos conduz a mutações no gene *mexR* (Ziha-Zarifi et al., 1999).

Tabela 1 - Sistemas de efluxo da *P. aeruginosa*.

Organismo	Componentes de efluxo			Genes reguladores	Substratos
	MFP	RND	OEP		
<i>P. aeruginosa</i>	MexA	MexB	OprM	<i>mexR</i>	Violeta cristal; Dodecilsulfato de sódio; Hidrocarbonetos aromáticos; B-lactâmicos; Fluoroquinolonas; Cloranfenicol; Tetraciclina; Tiolactomicina; Trimetoprim; Sulfonamidas; Triclosan; Macrólidos; Irgasan; Brometo de estídio; entre outros.
	MexC	MexD	OprJ	<i>nfxB</i>	Tetraciclina; B-lactâmicos; Cloranfenicol; Macrólidos; Trimetoprim; Violeta cristal; Brometo de etídio; Triclosan; Dodecilsulfato de sódio; Hidrocarbonetos aromáticos; entre outros.
	MexE	MexF	OprN	<i>mexT</i>	Fluoroquinolonas; Cloranfenicol; Trimetoprim; Hidrocarbonetos aromáticos; Triclosan; entre outros.
	MexX	MexY	OprM	<i>AmrR</i>	Fluoroquinolonas; Aminoglicosídeos; Tetraciclina; Eritromicina; entre outros.

Fonte: Adaptado de Poole, 2001.

1.1.1. Enzimas inativadoras de Aminoglicosídeos

A produção de enzimas que alteram/inactivam os aminoglicosídeos varia conforme a espécie e a estirpe bacteriana, sendo que um mesmo microrganismo pode produzir diferentes enzimas. As alterações causadas ocorrem em diferentes locais das moléculas de

aminoglicosídeos quer através de acetilação, quer por fosforilação e/ou adenilação (Mingeot-Leclerq et al., 1999).

Existem 19 tipos de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, agrupadas em três grupos, fosfotransferases, adeniltransferase e acetiltransferase. As fosfotransferases podem ser a 6-fosfotransferase e a 3'-fosfotransferase, as quais modificam a neomicina e a canamicina tornando a *P. aeruginosa* resistente naturalmente a estes aminoglicosídeos. Das acetiltransferases, a 3-acetiltransferase e a 2-adenilase, modificam a gentamicina e a tobramicina. A produção de 6'-acetiltransferase confere resistência também à amicacina (Mingeot-Leclerq et al., 1999).

1.1.2. Produção de β -lactâmicos

Todas as bactérias *P. aeruginosa* são produtoras constitutivas, em níveis baixos, de β -lactamase da Classe C de Ambler, AmpC. A indução desta enzima ocorre por antibacterianos β -lactâmicos, como a ampicilina e as cefalosporinas de 1.^a e 2.^a geração, os quais são considerados fortes indutores, sendo hidrolisados por ela. Os carbapenemos são fortes indutores da repressão do gene destas enzimas, sendo o meropenem mais estável que o imipenem à acção desta enzima (Livermore, 1992).

As β -lactamases de largo espectro sintetizadas pela *P. aeruginosa* pertencem às classes A, B e D de Ambler (Nordmann, et al., 1993).

A hiperprodução de β -lactamases da classe C, AmpC, confere resistência a todas as cefalosporinas, excepto as de 4.^a geração, e ao aztreonam, assim como as β -lactamases de largo espectro da classe A, ESBL, que conferem resistência às Cefalosporinas de 3.^a e 4.^a geração e ao aztreonam e, mais recentemente, a produção de carbapenases ou metalo- β -lactamases, as quais destroem os carbapenemos (Gales et al., 2003).

A *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente ao cloranfenicol, a tetraciclina e a algumas quinolonas e β -lactâmicos (Lauretti et al. 1999; Hirakawa et al. 2010).

1.2. Infecção

A *P. aeruginosa* é uma bactéria responsável por um grande número de infecções associadas aos cuidados de saúde e por muitas mortes a nível mundial por ano (Onguru et al. 2008).

As infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* (tabela 2) afectam na sua maioria a função pulmonar, seguida da urinária e das feridas e tecidos moles. As menos frequentes são as infecções por septicemia, mas também são as mais graves (Tsakris et al. 2009; Ding et al. 2009; Onguru et al. 2008; Hirsch et Tam 2011).

Para além do facto desta bactéria ser resistente intrinsecamente a alguns antibacterianos, a prescrição de antibacterianos, a utilização destes em animais dos quais nos alimentamos e o acesso não controlado a estes, são outros factores causadores de resistência bacteriana. A utilização de anti-sépticos também poderá ser uma das causas para este aumento.

Tabela 2 - Prevalência das Infecções Hospitalares por *P. aeruginosa* desde 2001 até 2010.

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES HOSPITALARES POR <i>P.aeruginosa</i>			
	2001 e 2002		2007
Infecção da pele e tecidos moles	Sem dados	9%	9,5%
Infecção Urinária	Sem dados	30%	19%
Infecção Pulmonar	61%	42%	33,3%
Septicémia	6%	6%	9,5%
Infecção Gastrointestinal	Sem dados	0%	14,3%

Adaptado de Pina et al 2009.

Entre 2007 e 2010 houve um aumento de infecções hospitalares na área médica, na área cirúrgica e nos cuidados intensivos. Na tabela 3 é possível ver a distribuição das Infecções Hospitalares por *P. aeruginosa* pelas áreas hospitalares.

Tabela 3 - Prevalência das infecções hospitalares por *P. aeruginosa* segundo os serviços hospitalares de 2007 a 2010.

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES HOSPITALARES POR <i>P. aeruginosa</i> SEGUNDO OS SERVIÇOS HOSPITALARES		
	2007	2010
Área Médica	10,1%	12,9%
Área Cirúrgica	6,3%	7,7%
Cuidados Intensivos	23,0%	26,7%

Adaptado de Pina et al 2009.

1.3. Controlo

O controlo de infecções bacterianas no contexto hospitalar depende da consciencialização dos profissionais de saúde para a importância deste na prevenção. Para além das regras básicas de higiene e esterilização de materiais e salas, os anti-sépticos e os antibacterianos também são utilizados no controlo das infecções bacterianas causadas por *P. aeruginosa*. Existe uma necessidade urgente de desenvolver meios alternativos de prevenção e controlo de infecções clínicas associadas a esta bactéria (Lo et al 2009; Baumann et al 2009).

1.3.1. Antibioterapia

Uma das formas de combater esta bactéria é ter conhecimento da sua susceptibilidade a antibacterianos e das suas características genéticas. Os antibacterianos mais utilizados no tratamento de *P. aeruginosa* são as penicilinas como a piperacilina, as cefalosporinas tais como a ceftazidima e a cefepima, os carbapenémicos como o imipenem e o meropenem, os monobactâmicos tais como o aztreonam, os aminoglicosídeos, como por exemplo a gentamicina, a tobramicina e a ampicacina e as fluoroquinolonas como a ciprofloxacina (Hirakawa et al. 2010; Onguru et al. 2008; Tam et al. 2010; Lo et al 2009).

1.3.1.1. Penicilinas

Tendo em conta a resistência à acidez gástrica e às β -lactamases, bem como o seu espectro de acção, as penicilinas encontram-se divididas em benzilpenicilina e fenoximetilpenicilina, aminopenicilinas, isoxazolilpenicilinas, carboxipenicilinas e ureidopenicilinas (Freeman et Wilcox, 2001; Khaleghi et al., 2011; Ellison, 2009; Kurochkina et al., 2011; Verdon et Couedor, 1998; Manuel, J et al., 2010). A estrutura geral encontra-se ilustrada na figura 3.

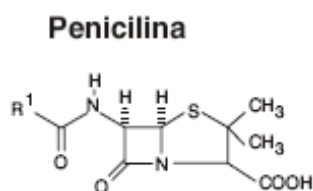
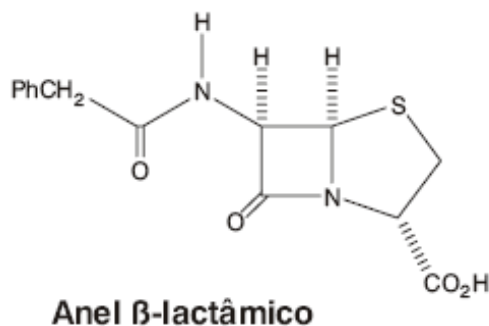


Figura 3 – Estrutura do anel β -lactâmico e da penicilina.

1.3.1.2. Cefalosporinas

A classificação das cefalosporinas inclui actualmente 4 grupos distribuídos de acordo com o seu espectro de actividade (tabela 4). As cefalosporinas são por isso divididas em cefalosporinas de 1.^a, 2.^a, 3.^a ou 4.^a gerações.

Tabela 4 – Tabela resumo do agrupamento das cefalosporinas por gerações.

Cefalosporinas de 1. ^a geração	Cefalotina
Cefalosporinas de 2. ^a geração	Cefuroxima, Cefpodoxima, Cefoxitina
Cefalosporinas de 3. ^a geração	Cefotaxima, Ceftazidima
Cefalosporinas de 4. ^a geração	Cefepima

As cefalosporinas de 1.^a geração apresentam um espectro de acção semelhante ao das aminopenicilinas, boa actividade contra bactérias gram-positivas, e apresentam maior resistência à hidrólise pelas β -lactamases (Quintiliani et al., 1982).

As cefalosporinas de 2.^a geração quando comparadas com as de 1.^a geração, apresentam menos actividade contra gram-positivas mas têm maior actividade contra gram-negativas (Quintiliani et al., 1982).

As cefalosporinas de 3.^a geração apresentam um espectro de acção ainda mais alargado no que respeita às bactérias gram-negativas, uma vez que são mais resistentes à hidrólise por β -lactamases (Zhao et al., 2007)

Posteriormente descobriram outras cefalosporinas consideradas de 4.^a geração (Petrikos et al., 2007). A estrutura geral das cefalosporinas encontra-se ilustrada na figura 4.

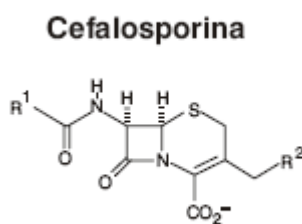


Figura 4 – Estrutura geral das cefalosporinas.

1.3.1.3. Carbapenemos

Estes apresentam um largo espectro de acção, quer sobre a maior parte das bactérias gram-positivas, excepto sobre estafilococos meticilina-resistentes, quer sobre as gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* spp., aeróbias e anaeróbias. O primeiro carbapenemo disponível foi o imipenem (Cook et al., 2011). A sua estrutura geral encontra-se na figura 5.

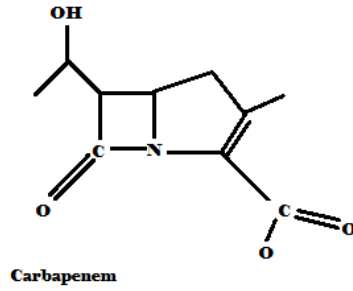


Figura 5 – Estrutura geral dos carbapenemos.

1.3.1.4. Monobactams

O único antibacteriano deste grupo disponível na terapêutica é o aztreonam, o qual é o primeiro β -lactâmico com ação exclusiva contra gram-negativas aeróbias (Honderlick, P, 2007). A sua estrutura geral encontra-se descrita na figura 6.

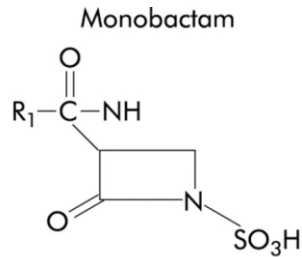


Figura 6 – Estrutura geral dos

monobactamos.

1.3.1.5. Amiglicosídeos

Estes são antibacterianos bactericidas tendo actividade contra gram-negativas aeróbias e contra *Staphylococcus aureus*. Não são absorvidos por via oral e apresentam o to e nefrotoxicidade.

A estrutura química da estreptomicina encontra-se ilustrada na figura 7.

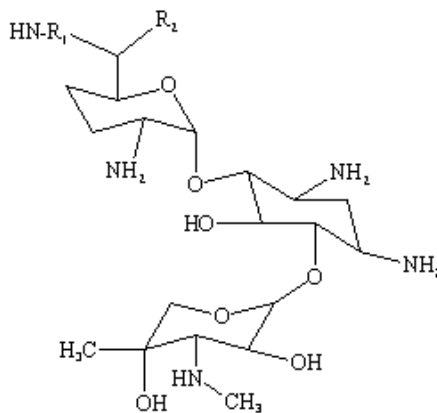


Figura 7 – Estrutura química da estreptomicina.

1.3.1.6. Fluoroquinolonas

O protótipo deste grupo de antibacterianos é o ácido nalidíxico. O seu espectro de acção engloba sobretudo gram-negativas.

A ciprofloxacina é considerada a de maior actividade antimicrobiana intrínseca.

O rápido aparecimento de resistências a este grupo, nomeadamente por *Pseudomonas*, tende a reduzir-lhe as potencialidades iniciais (Cook et al., 20011).

Na figura 8 encontra-se representada a sua estrutura química.

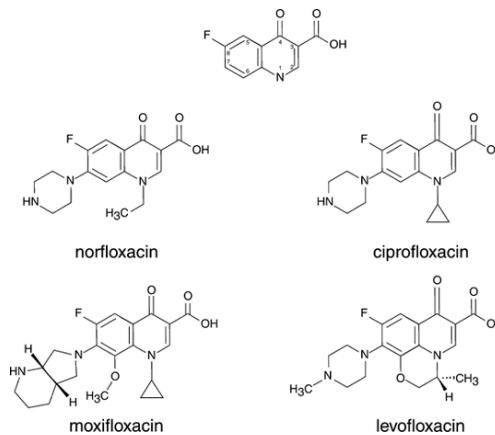


Figura 8 – Estrutura química das fluoroquinolonas geral e específicas.

1.4. Novas terapêuticas

A utilização repetida de antibacterianos sem prescrição e sem controlo torna mais frequente a ocorrência de bactérias multi-resistentes. Alternativas à antibioterapia incluem, entre outras, a fagoterapia, a vacinação e a nanotecnologia que poderão ser valiosas ferramentas no caso de deixarem de existir antibacterianos capazes de controlar a infecção por *P. aeruginosa* (Lo et al 2009; Baumann et al 2009; Kropinski 2006).

1.4.1. Vacinação

As proteínas encontradas na membrana externa da *P. aeruginosa*, denominadas de OMP, *outer membrane proteins*, no flagelo e, mais recentemente, no transporte de proteínas envolvidas na secreção pela *P. aeruginosa* são de grande interesse. Todas estas proteínas, que apresentam potencial para serem eficazes no estímulo de anticorpos para a vacina, estão ainda em estudo (Baumann et al 2007; Scarff et Goldberg 2008).

Outro ponto de partida para a vacinação é o lipopolissacarídeo, ou LPS. Este é conhecido por apresentar uma grande força atractiva entre o LPS e os anticorpos, os quais serão capazes de causar a destruição da célula bacteriana (Baumann et al 2007; Scarff et Goldberg 2008).

Estudos realizados mostraram o retardamento de infecções pulmonares, como a Fibrose cística, causadas por *P. aeruginosa* (Baumann et al 2007; Scarff et Goldberg 2008).

1.4.2. Fagoterapia

Um dos métodos alternativos disponíveis à antibioterapia é a fagoterapia (Kropinski 2006; Sulakvelidz 2001).

Com os conhecimentos actuais sobre bacteriófagos e com o aparecimento de resistência bacteriana a antibacterianos, a fagoterapia voltou a ser pesquisada e vista como terapêutica alternativa plausível e/ou como um suplemento à antibioterapia (Kropinski 2006; Sulakvelidz 2001).

A fagoterapia envolve o uso de bacteriófagos, ou fagos, no combate a infecções bacterianas. Estes são vírus bacterianos e desde muito cedo que são utilizados como terapêutica de substituição à antibioterapia. Esta terapêutica foi abandonada, inicialmente, por falta de conhecimentos sobre os fagos. Outros factores foram a utilização indiscriminada destes por caracterizar e em concentrações desconhecidas, assim como, a aplicação de um qualquer fago a uma qualquer estirpe bacteriana (inespecíficos). Estes foram os principais motivos para o abandono da fagoterapia (Kropinski 2006; Sulakvelidz 2001).

A sua estrutura encontra-se ilustrada na figura 9.

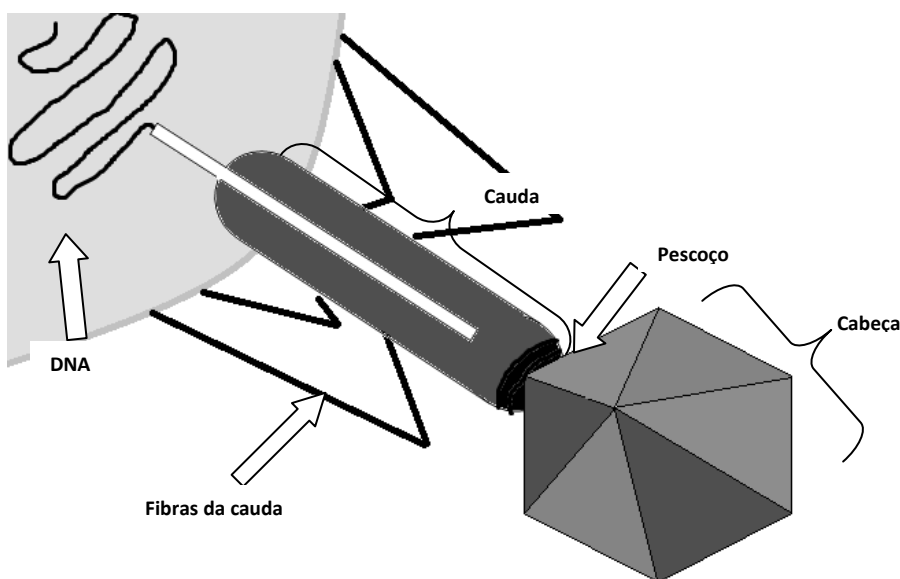


Figura 9 – Estrutura do bacteriófago.

Os fagos são vantajosos pois apresentam uma elevada especificidade bacteriana e não toxicidade para animais e plantas. Estes podem ser encontrados o solo e na água em maior quantidade do que as bactérias (Kropinski 2006; Sulakvelidz 2001).

1.4.3. Nanotecnologia

Uma das grandes dificuldades do tratamento farmacológico é o excesso de medicamentos utilizados. Quando administramos um antibacteriano para o tratamento de uma qualquer infecção estamos a dar doses elevadas deste a células/tecidos/órgãos saudáveis do nosso organismo, causando, muitas vezes, intoxicação por medicamentos (Taylor et Webster 2011).

A nanotecnologia trouxe uma nova visão do tratamento farmacológico. Esta está a estudar formas de produzir e administrar fármacos de dimensões nanométricas, a partir de soluções com princípios activos de um antibacteriano e um anti-inflamatório, por exemplo (Taylor et Webster 2011).

Através de fenómenos físicos, químicos e biológicos e de estruturas com dimensões na ordem de um bilionésimo do metro, i.e., o comprimento equivalente a 10 átomos de hidrogénio alinhados, transportam as substâncias com acção farmacológica até às células lesadas. Estas nanopartículas são lipossomas, nanocarregadores, fosfolípidos ou polímeros biodegradáveis, i.e., substâncias biológicas capazes de serem assimiladas pelo organismo humano (Taylor et Webster 2011).

A sua manipulação decorre num *Spray dryer* ou *Spray drying* nano, onde as substâncias são transformadas em gotas e “embaladas” em nanocápsulas de diversos tamanhos. Depois disto podem ser injectadas na corrente sanguínea, aplicadas na pele, feridas, mucosas, ou via oral. As nanopartículas do fármaco atravessam a membrana celular das células lesionadas por forças de atracção molecular. A libertação do fármaco ocorre de forma mais concentrada nas células lesionadas, não atingindo as células sãs (Taylor et Webster 2011).

Os nanofármacos, para além de injectados, também podem ser administrados sob a forma de pomada, suspensão oral ou comprimidos (Taylor et Webster 2011).

A utilização desta terapia visa evitar os efeitos colaterais causados pela maior parte dos fármacos, principalmente em situações oncológicas (Taylor et Webster 2011).

Os nanoveículos podem ser micropartículas do polímero de quitosano, substância biodegradável derivada dos crustáceos, para administração oral. Os fármacos elaborados com esta substância são melhor tolerados pelo sistema gastrointestinal quando comparados com um comprimido tradicional. Outro veículo possível e ainda em estudo, são as nanopartículas

lipídicas, similares às membranas celulares humanas, extraídas da soja e do ovo. Estes lipossomas são utilizados para encapsular e transportar vários fármacos em doses bastante inferiores às utilizadas na actualidade (Taylor et Webster 2011).

1.5. Objectivos

Compreender na população portuguesa a importância do aumento crescente de resistência a antibacterianos pela *P. aeruginosa* no contexto da saúde pública no sentido de desenvolver uma estratégia terapêutica que não recorra ao uso de medicamentos antibióticos. A moderna biotecnologia apresenta diversas estratégias ao uso de antibióticos. Pretende-se neste estudo, desenvolver uma terapia com recurso a fagos da *P. aeruginosa*. Na primeira parte do estudo, transformou-se uma *P. aeruginosa* com um gene da GFP. A segunda parte do trabalho teve como objectivo desenvolver uma fórmula terapêutica com um fago da *P. aeruginosa*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Instrumentos e Químicos

2.1.1. Instrumentos

Os instrumentos utilizados ao longo do estudo laboratorial foram Ansas descartáveis, Autoclave (Uniclave 88 AJC), Balança (KERN and Sohn GmbH), Banho de gelo, Banho-maria (FALC), Cartuchos perfuráveis (Campingaz C206), Cronómetro (NOKIA), *Eppendorfs*, Espátulas metálicas, Estufa (Binder), Hote (F. S. Móvel), Lâmpada UV/transiluminador (VILBER LOURMAT 215-LC/ECX 15-M), Micropipetas P10, P100 e P1000 (SOCOREX), Pipetas de Pasteur, Placas de petri, Pontas para micropipetas P10, P100 e P1000 (lab box), Soldador de Laboratório (Campingaz Labogaz 470), Tubos de ensaio (SCHOIT GL18) e Vidros de relógio.

2.1.2. Químicos e Kits

Os químicos e *kits* utilizados foram o Agar granulado (DIFCO), 25mg/mL Ampicilina (AMP), o Cloreto de sódio (Carlo ERBa), o extracto de levedura (OXOID), a L(+)Arabinose a 100mM (BioRAD), a Solução de transformação a 50 mM CaCl₂ e pH 6,1 (BioRAD) a Triptona (Sigma).

2.1.3. Bactéria e Plasmídeo

Relativamente à Bactéria e Plasmídeo utilizados são *P. aeruginosa* estirpe *DSM 19880* (Innophage) e pGLO (BioRAD), respectivamente.

2.2. Meios e Aditivos dos Meios

2.2.1. Meio de Crescimento

O meio Luria-Bertani (LB) foi usado como meio complexo standard para o crescimento de *P. aeruginosa*. A composição é baseada no protocolo de Sambrook (1989) e consiste em 1% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) extracto de levedura e 0,5 % (m/v) NaCl, em água desionizada.

Para as placas de meio sólido adicionou-se 15 g/L de agar ao meio.

O meio selectivo para *P. aeruginosa* foi usado como meio ideal para o crescimento isolado esta bactéria. A sua composição é baseada no meio selectivo com cetrimida e consiste em Peptona 4g, Sulfato de Potássio 2,5g, Cloreto de Magnésio 0,28g, Cetrimida 12g e Agar 3g, em água desionizada.

A Peptona serve como fonte de Azoto. A produção de piocianina é estimulada pelo cloreto de magnésio e pelo sulfato de potássio presentes no meio. A Cetrimida (brometo de

cetilmetilamina) é um composto amónio quaternário, que inibe uma vasta variedade de outros organismos, incluindo outras espécies de *Pseudomonas* spp. e organismos relacionados.

2.2.2. Aditivos dos Meios

Foram utilizadas soluções stock concentradas de aditivos aos meios tais como Arabinose a 100mM e Ampicilina a 25mg/mL, entre outros antibacterianos, em condições de assepsia.

2.3. Preparação de DNA bacteriano

Na preparação de DNA bacteriano para análise por PCR colhe-se uma colónia isolada e ressuspende-se em 1mL de água *autoclavada* num tubo micro. De seguida, vai à centrífuga durante 1 minuto a 10,000 – 12,000 rpm e remove-se o sobrenadante. Depois são adicionados 200µL de matriz *InstaGene* ao *pellet* e coloca-se a incubar a 56°C durante 15 – 30 minutos.

É importante que a matriz *INSTAGENE* deve ser misturada a velocidade moderada num misturador magnético para manter a matriz em suspensão. A pipeta utilizada deve ser de grande tamanho, como por exemplo 1000 µL

No vortex a elevada velocidade por 10 segundos, coloca-se o *pellet* recolhido. O tubo é colocado numa placa de aquecimento a 100°C ou em banho-maria durante 8 minutos. De seguida usa-se o vortex novamente a elevada velocidade durante 10 segundos e roda-se a 10,000-12,000 rotações por segundo durante 2-3 minutos. No final usam-se 20µL do sobrenadante resultante por 50µL de reacção de PCR. O sobrenadante restante é armazenado a 20°C.

Aquando da reutilização da preparação de DNA, repete-se o 5.º passo.

É importante que a amostra preparada seja armazenada a -20°C.

2.4. Técnicas Microbiológicas

2.4.1. Esterilização

Todos os meios e materiais a utilizar, não termolábeis, foram autoclavados a 121°C e a uma pressão de 1 bar positivo durante 20 minutos.

2.4.2. Condições Gerais de Crescimento

Todas as culturas bacterianas foram incubadas a 37°C em estufa. O tempo de incubação dependeu da técnica usada e é indicado nesta.

2.4.3. Armazenamento da Estirpe Bacteriana

A estirpe de *P. aeruginosa* utilizada foi preparada para um armazenamento a longo prazo por congelamento. Para tal retirou-se uma colónia de bactérias crescidas em placa com meio e molhou-se a ansa no líquido do frasco de congelamento. Reservam-se os frascos bem fechados no congelador a -20°C .

2.4.4. Transformação bacteriana

A transformação bacteriana começa pela preparação do meio para crescimento bacteriano e distribuição deste em placas, reservando metade, e guardando em estufa a 55°C . Ao meio restante, adicionar a ampicilina de forma a obter uma concentração final de $100\mu\text{g/mL}$ e a L-arabinose até uma concentração final de 6mg/mL . As placas são armazenadas no frigorífico até usar (no máximo 3 dias). Na véspera, descongela-se a *P. aeruginosa* e semeia-se no meio, deixando a incubar a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante a noite.

Para 2 microtubos limpos e estéreis e em condições de assépsia transferem-se $250\mu\text{L}$ de solução de transformação (CaCl_2) com a micropipeta P1000 e uma ponta estéril e colocam-se em gelo. Com uma ansa estéril, em condições de assepsia, retira-se uma única colónia bacteriana e coloca-se no microtubo e rodando a ansa para a esquerda e para a direita até que a colónia se dissolva no meio de transformação e repete-se o processo para o segundo microtubo, terceiro e quarto. Observa-se o plasmídeo na luz UV. Com a micropipeta P10 e uma ponta estéril pipetam-se $10\mu\text{L}$ de plasmídeo ($0,08\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e coloca-se sem agitar nos microtubos colocando novamente no gelo. Deixam-se os microtubos a incubar em gelo durante 10-15 minutos. Passados os 10/15 minutos, exerce-se um choque térmico a 42°C durante rigorosamente 50 segundos, findos os quais se colocam de novo os microtubos em gelo. Em condições de assepsia abrem-se os microtubos e transfere-se com a ponta P1000 $250\mu\text{L}$ de meio líquido para cada um deles, usando em cada pipetagem uma nova ponta. Trocando sempre de ponta em cada pipetagem, transferem-se $100\mu\text{L}$ com a micropipeta P100 dos microtubos para cada uma das placas. Com uma ansa estéril espalham-se as gotas na superfície de cada placa. Selam-se com parafilme e colocam-se na estufa a 37°C . Passadas 24 horas analisa-se cada placa no transiluminador.

Se fluorescente, está presente o plasmídeo que confere resistência, caso contrário, este está ausente.

Este processo foi sofrendo alterações ao protocolo inicial ao longo do estudo para otimizar as condições. Utilizaram-se também meios diferentes tais como com ampicilina e arabinose, sem fonte de carbono para além da arabinose, e enriquecendo-o em sais minerais, ou seja, água, agar, muito pouco extracto de levedura, ampicilina e arabinose.

2.4.5. Teste da Nitrocefina

Usando uma pinça esterilizada, remove-se um disco com nitrocefina do frasco e coloca-se numa caixa de petri vazia. De imediato guardam-se os restantes discos no frigorífico a - 10°C.

Retira-se uma colónia isolada com uma zaragatoa ou com uma ansa esterilizadas e espalha-se na superfície do disco.

Observa-se o disco inoculado até mostrar alteração da sua cor.

Aguardam-se 5 minutos.

Caso o resultado seja positivo há alteração da cor, caso contrário mantém-se da mesma cor.

2.4.6. Reacção PCR

Usando a amostra de DNA extraído da bactéria em estudo leva-se ao vortex a velocidade elevada por 10 segundos e rotação a 10 000 – 12 000 rpm por 2-3 minutos.

O *mastermix* é preparado através do descongelamento dos *stocks*, mantendo-os sempre no frio, pipetam-se 72,5µL de água num *ependorf* normal. De seguida, pipetam-se 12,5µL de buffer 10x, sem MgCl₂, 3,75µL de MgCl₂, 2,5µL de dNTP's, 1,25µL de cada primer (GFP – R; GFP – F), 1,25µL de Taq lentamente por causa da sua viscosidade. Agita-se a mistura gentilmente com a ponta do dedo indicador.

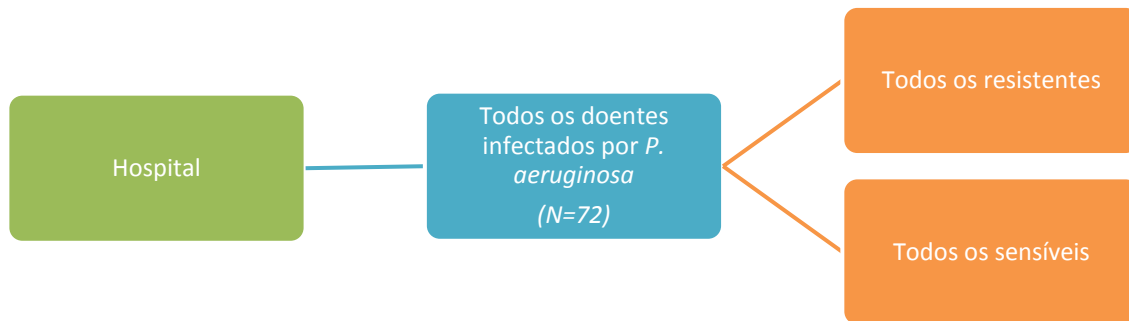
Depois pipetam-se 20µL do *mastermix* para 4 microtubos de PCR e a cada microtubo adicionam-se 5µL do DNA extraído de *P. aeruginosa*. O termociclador é programado para os ciclos de 1 vez a 94°C durante 2 minutos, de 30 vezes a 94°C durante 40 segundos, a 52°C durante 45 segundos e a 72°C durante 1 minuto e meio e no último ciclo 1 vez a 4°C por tempo indeterminado.

2.4.7. Preparação do Gel de electroforese

A composição do gel de electroforese, para 100mL, consiste em 0,8g de agarose e 100mL de TAE 1x. Para a preparação do TAE 1x é utilizada uma relação de 50miliLitros para 1Litro (**50mL : 1L**). Depois de tudo pesado e medido vai a fundir ao microondas até homogeneizar (aproximadamente 1 minuto e 10 segundos) na potência máxima. Deixa-se arrefecer (morno) e prepara-se o suporte de gel. Acrescentam-se 4µL de Brometo de etídeo ou *cyber green* (10mg/mL) e mistura-se com agitação leve. Verte-se a solução de gel no suporte sem que faça bolhas. Coloca-se o pente da espessura desejada no suporte (ter em atenção o n° e o volume das amostras na escolha do pente mais adequado). Deixa-se que a solução solidifique. Coloca-se o suporte com o gel na cuba de electroforese e adiciona-se o tampão TAE 1x até cobrir a superfície do gel.

2.5. População

De forma a estimar a prevalência de infecções resistentes por *P. aeruginosa* seleccionou-se a população em estudo segundo o diagrama a seguir representado:



Pretende-se elaborar um estudo sobre toda a população de pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa* nos hospitais de Portugal. O ideal seria ter acesso aos últimos dados bacteriológicos/antibiograma e bioquímicos dos pacientes com infecção hospitalar causada por *P. aeruginosa*. Para um melhor estudo seria necessário aumentar o N populacional de modo a poder extrapolar para o universo. Extender-se-ia esta pesquisa aos hospitais de todo o país e aumentar-se-ia a informação colectada quer no exame bacteriológico/antibiograma, quer nos exames bioquímicos.

A população de pacientes em análise pertence a um determinado hospital da região Norte de Portugal, e consiste em 72 pacientes com infecção causada por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Visto tratar-se de uma população não foram realizados quaisquer testes probabilísticos e apenas se recorreu à estatística descritiva.

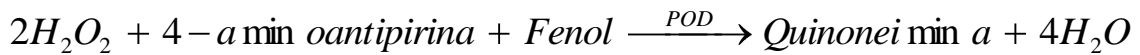
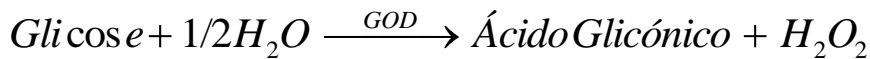
2.5.1. Métodos Estatísticos

Os dados bioquímicos e bacteriológicos/antibiograma obtidos num determinado hospital da região Norte foram introduzidos no programa Portable IBM SPSS Statistics v19 para serem posteriormente tratados e analisados. O Microsoft Office Excel 2007 serviu de apoio.

2.5.1.1.1. Testes laboratoriais

De acordo com as últimas recomendações do CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

A dosagem de Glicose envolve a glicose oxidase (GOD), a qual catalisa a oxidação da glicose a ácido glicónico e peróxido de hidrogénio. Através de uma reacção oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogénio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 500 nm, é directamente proporcional à concentração de glicose na amostra.



A dosagem da Proteína C reactiva (PrCR) é normalmente utilizada para determinar a presença/ausência de inflamação. O sangue recolhido num tubo separador de soro é analisado laboratorialmente. Existem diversos métodos de determinação de PrCR, tais como ELISA, imunoturbidimetria, imunodifusão rápida e aglutinação visual. Para a determinação de PrCR de alta sensibilidade a nefelometria é utilizada muitas vezes. Este teste apresenta resultados em 25 minutos com uma sensibilidade de 0,04mg/L.

3. Resultados e Discussão

3.1. Resultados Estatísticos

Foram analisados 72 relatórios bacteriológicos/antibiograma e bioquímicos de pacientes de um determinado hospital da região Norte de Portugal. Da análise estatística realizada, relativamente às idades dos pacientes, a idade mínima é de 1 ano e meio e a máxima de 95 anos. As idades mais frequentes entre os pacientes são de 78 e 88 anos (6,97%). Pela medida de assimetria é possível verificar que existe um grupo pequeno com valores muito pequenos, i.e., a idade dos pacientes internados é maioritariamente acima dos 68 anos (ver tabela 4 e gráfico 1).

A diferença entre o Percentil 75 e 25 descreve a variação dos dados, assim sendo, temos o âmbito das idades de 28,75. Segundo a medida de assimetria, a qual é negativa, temos que esta distribuição é assimétrica, estando perante uma assimetria negativa, na qual

Relativamente à mediana, estamos perante um valor estatisticamente significativo. A mediana é uma medida de tendência central que caracteriza as observações de uma determinada variável de tal forma que o seu valor separa a metade inferior da amostra, da metade superior, i.e., metade dos pacientes têm idades iguais ou inferiores a 78,5 anos e a outra metade tem idades superiores ou iguais à mediana.

O paciente mais novo tem 1,5 anos e o paciente mais velho tem 95 anos de idade.

Tabela 5 - Estatística Descritiva sobre a idade dos pacientes internados.

Idade		
N		72
Média		68,113
Mediana		78,500
Moda		78,0
		88,0
Desvio Padrão		26,4339
Medida de Assimetria		
(grupo pequeno com valores muito pequenos)		-1,292
Desvio padrão da Medida de Assimetria		0,283
Mínimo		1,5
Máximo		95,0
Percentis	25	58,000
	50	78,500
	75	86,750

Relativamente ao sexo traçou-se um gráfico de barras de forma a caracterizar essa variável segundo a idade dos pacientes (ver gráfico 1), sendo que 59,7% dos pacientes são do sexo feminino e 40,3 % do sexo masculino. A idade foi agrupada segundo seis grupos do seguinte modo [0,15];]15,30];]30,45];]45,60];]60,75]; >75.

Nas idades mais baixas existem somente pacientes do sexo feminino e o mesmo acontece relativamente ao sexo masculino entre os 45 e os 60 anos. Dos 15 aos 30, dos 30 aos 45 e nos pacientes com mais de 75 anos existe um predomínio do sexo feminino sobre o masculino. No grupo dos 60 aos 75 anos existe o mesmo número de homens e de mulheres (ver gráfico1).

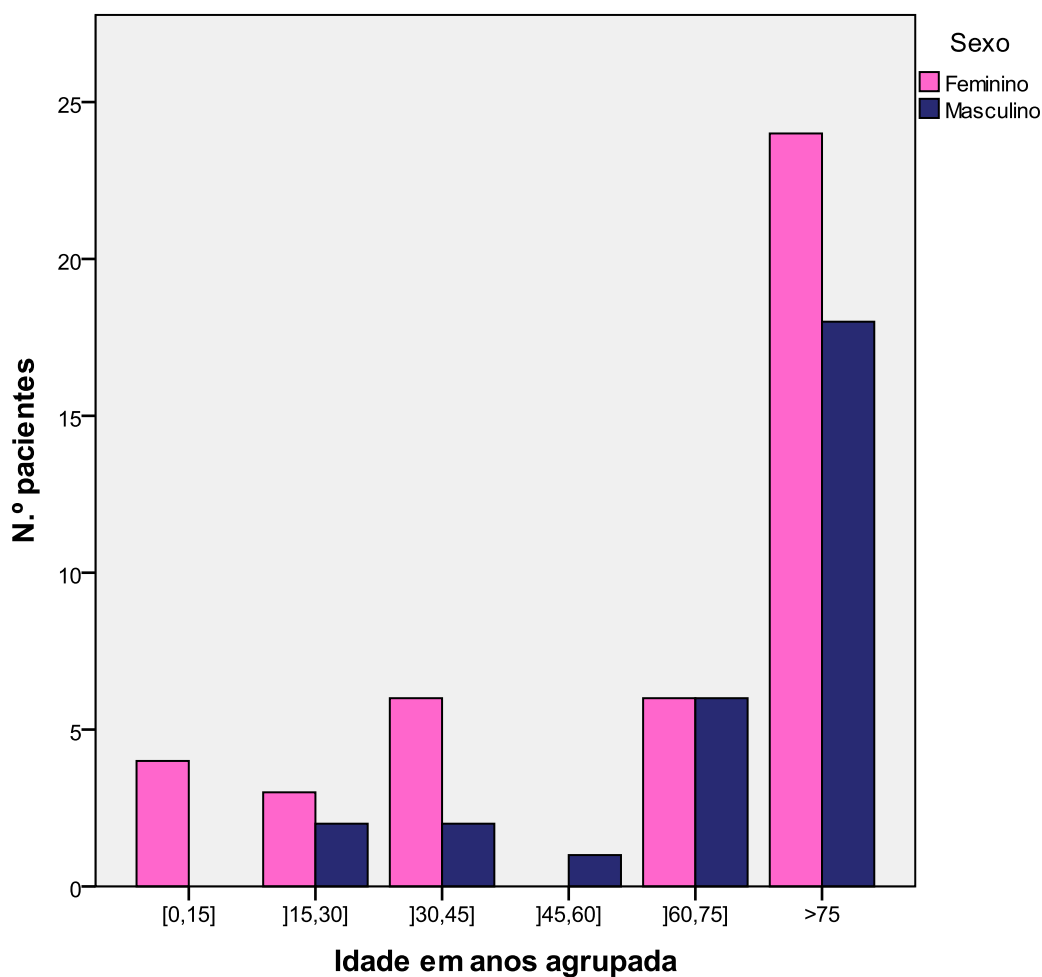


Gráfico 1 – Distribuição da idade por grupos de faixas etárias segundo o sexo dos pacientes.

A caracterização da população segundo a glicose encontra-se descrita no gráfico 2. Na população de 72 pacientes, 73,61% é não diabético e 26,39% é diabético.

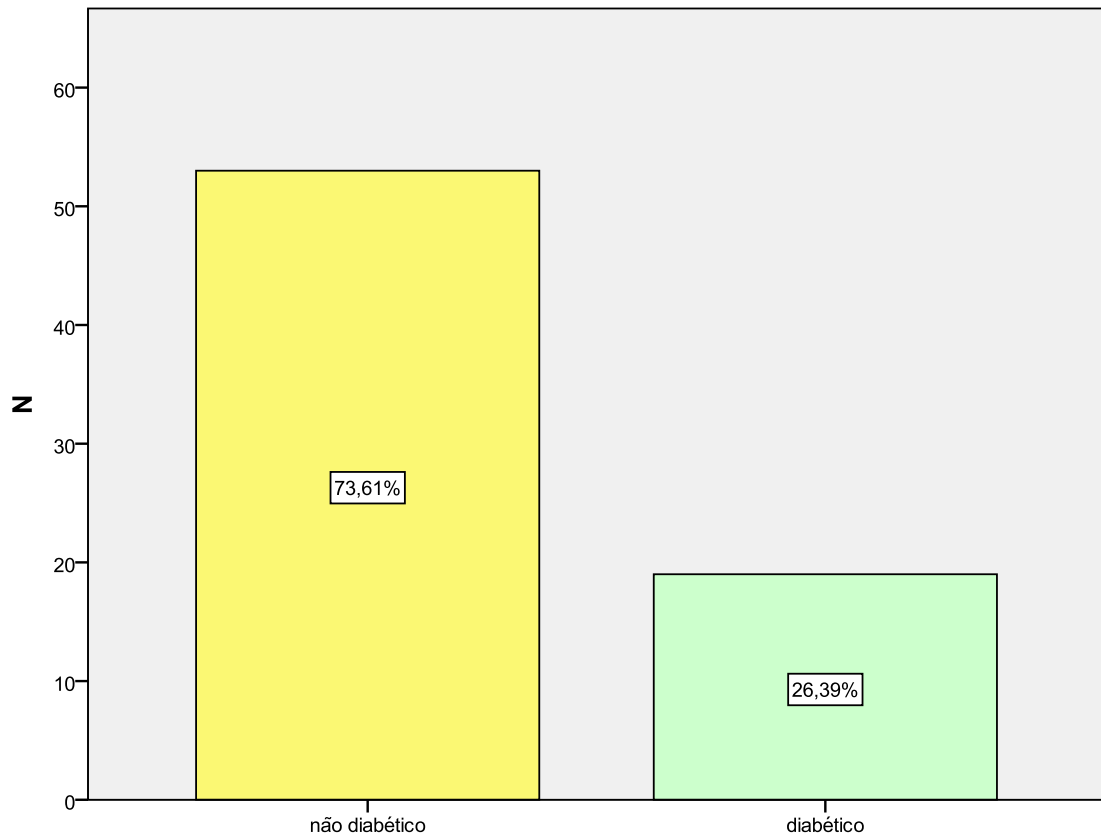


Gráfico 2 – Frequência de pacientes diabéticos e não diabéticos.

O Serviço com maior número de pacientes internados é a Unidade de Medicina Adultos (27,78%), segue-se o Internamento Medicina (25,00%) e o terceiro serviço com mais pacientes é o de Medicina (piso 5) (13,89%) (ver gráfico 3).

Fagoterapias para infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes

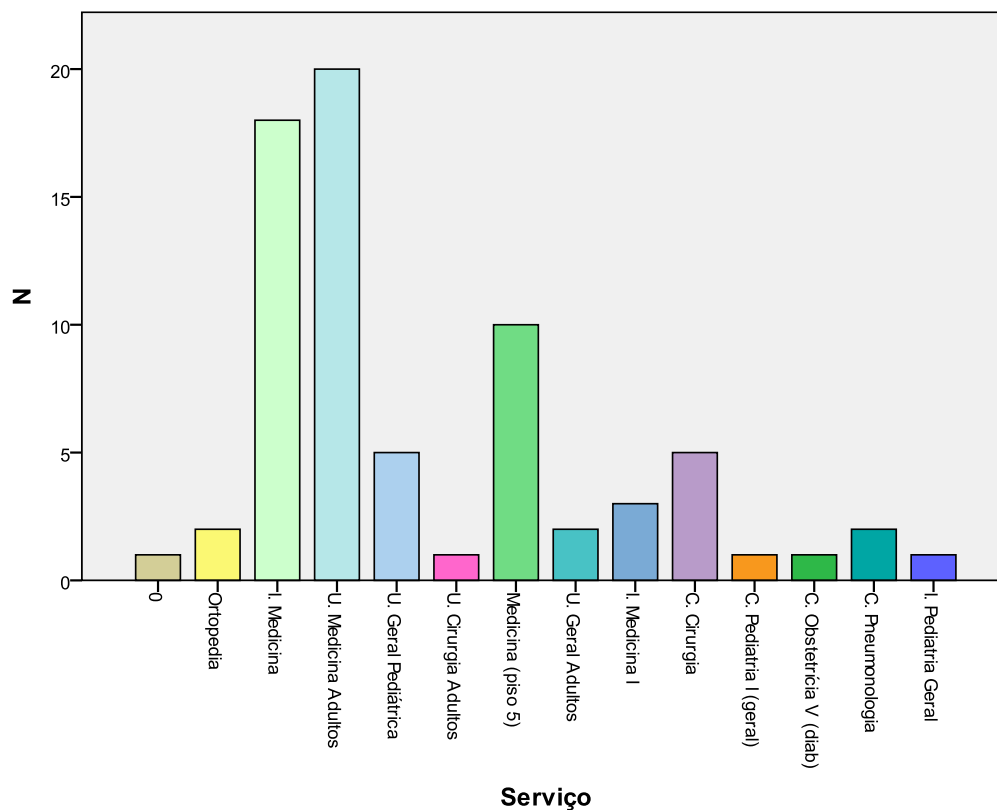


Gráfico 3 – Distribuição dos pacientes por serviço hospitalar.

Relativamente aos locais de infecção, a amostra é constituída por 72 pacientes, 9 (12,5%) têm Infecções nos tecidos moles, 22 (30,6%) apresentam Infecções urinárias, 3 (4,2%) têm Septicémia e 38 (52,8%) apresentam Infecções do tracto respiratório ($M_o = 4$) (ver tabelas 6 e 7 e Gráfico 4).

Tabela 6 – Estatísticas Descritivas dos Locais de Infecção.

Estatísticas	
N	72
Moda	4,00

Tabela 7 – Locais de Infecção – Frequências Absoluta e Relativa.

	Frequência	Frequência Relativa
Feridas/Infecções Tecidos Moles	9	12,5%
Urina/Infecções Urinárias	22	30,6%
Sangue/Septicémias	3	4,2%
Infecções Tracto Respiratório	38	52,8%

Fagoterapias para infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes

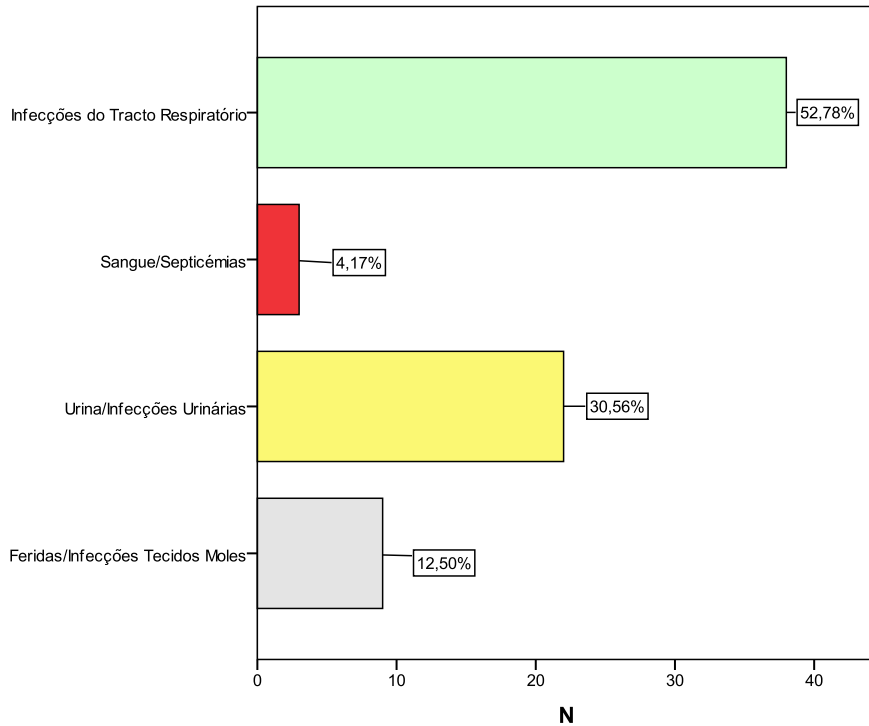


Gráfico 4 – Locais de Infecção e sua frequência.

Consideremos duas variáveis contínuas, a idade dos pacientes e o valor de glicose. Pretendemos ver como a variação da idade poderá influenciar o valor de glicose no sangue (ver gráfico 5).

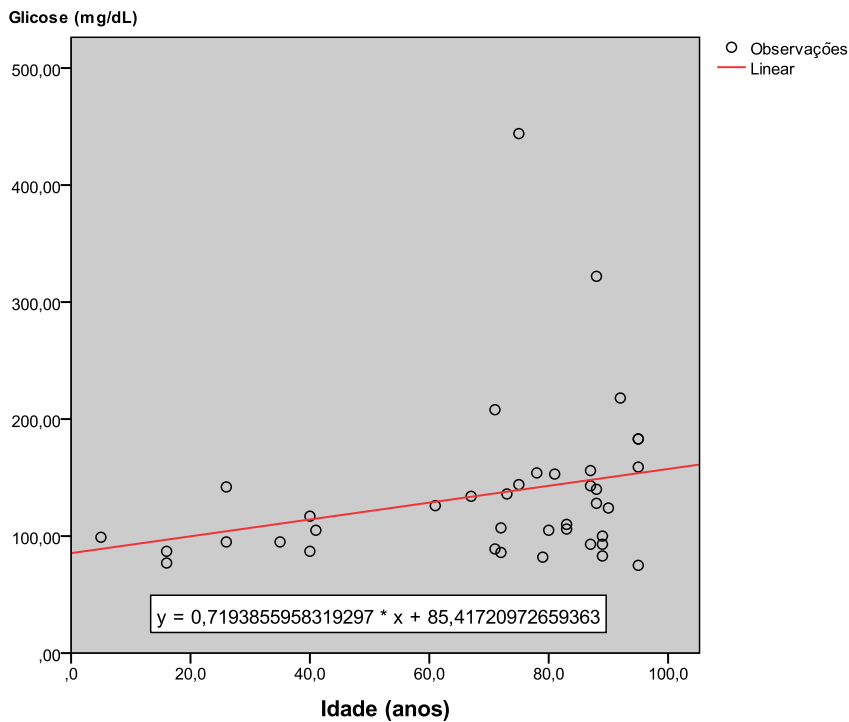


Gráfico 5 – Glicose (mg/dL) vs Idade (anos).

Em 72 pacientes, 41 (56,9%) não são diabéticos, dos quais 16 são do sexo masculino e 25 do sexo feminino, e 31 (43,1%) são diabéticos, dos quais 13 são do sexo masculino e 18 do sexo feminino ($Mo = sexo\ feminino$) (ver tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Estatística descritiva.

Estatísticas	
N	72
Moda	Sexo feminino

Tabela 9 – Frequência, percentagem.

	Frequência	Frequência Relativa
Glicose ≤ 90	41	56,9%
Glicose > 90,1	31	43,1%

Num total de 46 pacientes nos quais foi testada a Amoxicilina + Ácido Clavulânico, 45 apresentaram resistência a estes, enquanto somente 1 paciente evidenciou sensibilidade. Dos 45 resistentes 24 eram não diabéticos e 21 eram diabéticos.

Para a Amicacina, em 45 pacientes nos quais foi usada no antibiograma, 40 apresentaram sensibilidade a esta, enquanto apenas 5 mostraram resistência a esta. Dos 40, 24 eram não diabéticos e 16 diabéticos. Dos 5 apenas 1 era diabético.

No que respeita à Ampicilina, em 46 pacientes sujeitos a antibiograma, apenas 1 mostrou sensibilidade e os restantes 45 evidenciaram resistência a esta. Destes 45, 24 não eram diabéticos e 21 eram Diabéticos.

Passa-se exactamente o mesmo relativamente à Cefotaxima. A Cefalotina, em 69 pacientes, nos quais esta foi testada no antibiograma, 49 apresentaram sensibilidade a esta, enquanto 20 apresentaram resistência. Destes 20 pacientes, 9 eram diabéticos e 11 não diabéticos.

No que diz respeito à Gentamicina, esta foi testada em todos os pacientes, i.e., em 72 pacientes. Destes apenas 14 mostraram resistência enquanto os restantes 58 evidenciaram sensibilidade a esta. Dos 14 resistentes, 6 eram diabéticos e 8 não diabéticos.

O Meropenem foi testado em 29 pacientes. Destes apenas 6 mostraram resistência a este, enquanto 23 apresentaram sensibilidade.

A Tobramicina foi testada em 31 pacientes. Destes apenas 5 apresentaram resistência, sendo 1 diabético e 4 não diabéticos.

A associação Trimetoprim + Sulfametoxazol foi testada em 71 pacientes. Destes 70 apresentaram resistência, sendo 31 diabéticos e 39 não diabéticos. Apenas 1 paciente evidenciou sensibilidade a este.

Relativamente à Levofloxacina, em 16 pacientes apenas 5 mostraram resistência e tratava-se de diabéticos, enquanto os restantes 11 eram sensíveis.

A Nitrofurantoína foi utilizada no antibiograma de 21 pacientes. Todos os pacientes apresentaram resistência a esta sendo 11 não diabéticos e 10 diabéticos.

A Tigeciclina foi testada em 15 pacientes e todos apresentaram resistência a esta, sendo 8 diabéticos e 7 não diabéticos.

No que respeita à Cefpodoxima, em 12 pacientes testados, todos apresentaram resistência a esta sendo 8 diabéticos e 4 não diabéticos.

Na associação Piperacilina + Tazobactam, em 60 pacientes, apenas 12 apresentaram sensibilidade, os restantes 48 pacientes apresentaram resistência sendo 24 pacientes diabéticos e 24 não diabéticos.

A Tetraciclina foi utilizada em 10 pacientes e todos eles evidenciaram resistência a esta sendo 4 diabéticos e 6 não diabéticos.

A Cefoxitina foi aplicada no antibiograma de 27 pacientes. Destes todos apresentaram resistência a esta sendo 12 diabéticos e 15 não diabéticos.

O Imipenem foi testado em 34 pacientes, destes apenas 7 apresentaram resistência a este sendo 3 diabéticos e 4 não diabéticos.

No que respeita ao Aztreonam, em 20 pacientes, 14 apresentaram resistência sendo 5 diabéticos e 9 não diabéticos. Os restantes 6 apresentaram sensibilidade a este.

A Cefepima foi utilizada em 15 pacientes. Destes, 8 apresentaram resistência sendo 3 diabéticos e 5 não diabéticos.

A Minociclina foi aplicada em 26 pacientes, os quais apresentaram todos resistência a esta. Destes 11 são diabéticos e 15 não diabéticos.

Na Pefloxacina, em 26 pacientes nos quais foi aplicada apenas 14 apresentaram resistência dos quais 5 diabéticos e 9 não diabéticos.

A Piperacilina foi utilizada em 12 pacientes dos quais 6 apresentaram resistência. Destes apenas 1 é diabético enquanto 5 são não diabéticos.

A Ticarcilina foi aplicada em 10 pacientes sendo 7 resistentes. Destes apenas 1 é diabético e os restantes 6 são não diabéticos.

Relativamente à Ticarcilina + Ácido Clavulânico, esta associação foi utilizada no antibiograma de 25 pacientes, apresentando 12 resistência e 13 sensibilidade. Dos resistentes 5 são diabéticos e 7 não diabéticos.

A colistina foi testada em 19 pacientes. Destes 5 apresentaram resistência sendo 3 diabéticos e 2 não diabéticos.

No que respeita à Isepamicina, esta foi testada em 11 pacientes dos quais 9 mostraram ser sensíveis e 2 resistentes.

A Norfloxacinina foi testada em 26 pacientes dos quais 8 apresentaram resistência sendo 1 diabético e 7 não diabéticos.

Estes dados encontram-se descritos no Gráfico 6.

Fagoterapias para infeções por *P. aeruginosa* multirresistentes

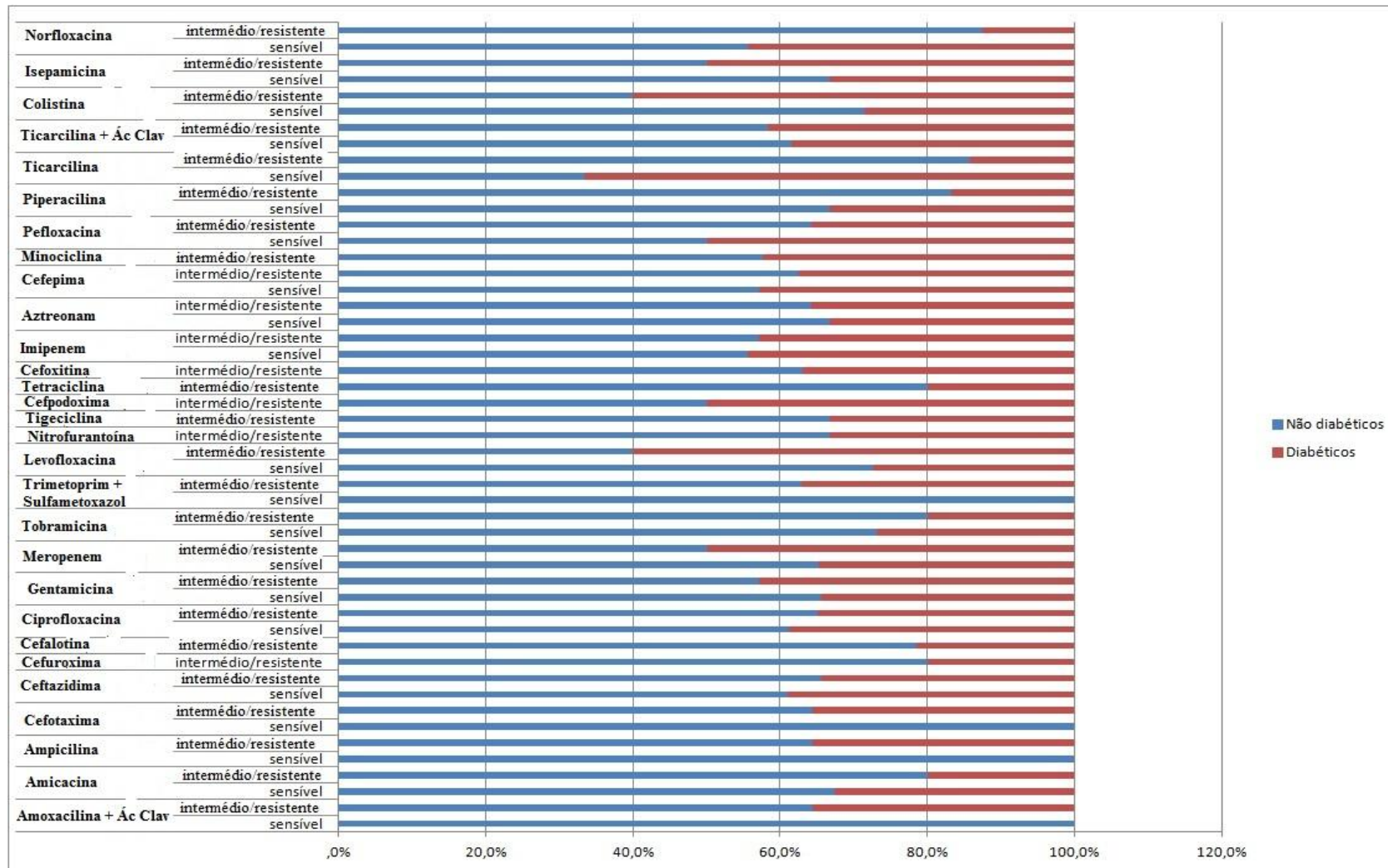


Gráfico 6 – Relação entre a resistência/sensibilidade a antibacterianos com o facto de ser um paciente diabético/não diabético.

Num total de 45 pacientes nos quais foi testada a Amoxicilina + Ácido Clavulânico, 44 apresentaram resistência a estes, enquanto somente 1 paciente evidenciou sensibilidade. Dos 44 resistentes 26 têm valores normais de Proteína C reactiva 18 têm valores elevados de Proteína C reactiva.

Para a Amicacina, em 44 pacientes nos quais foi usada no antibiograma, 39 apresentaram sensibilidade a esta, enquanto apenas 5 mostraram resistência a esta. Dos 39, 21 têm valores normais de Proteína C reactiva e 18 valores elevados.

No que respeita à Ampicilina, em 45 pacientes sujeitos a antibiograma, apenas 1 mostrou sensibilidade e os restantes 44 evidenciaram resistência a esta. Destes 44, 26 têm valores normais de Proteína C reactiva e 18 têm valores elevados. Passa-se exactamente o mesmo relativamente à Cefotaxima.

A Cefalotina, em 14 pacientes, nos quais esta foi testada no antibiograma, todos apresentaram resistência a esta. Destes, 11 têm valores normais de Proteína C reactiva e 3 têm valores elevados.

No que diz respeito à Gentamicina, esta foi testada em 71 pacientes. Destes apenas 14 mostraram resistência enquanto os restantes 57 evidenciaram sensibilidade a esta. Dos 14 resistentes, 5 têm valores normais de Proteína C reactiva e 9 têm valores elevados desta.

O Meropenem foi testado em 28 pacientes. Destes apenas 6 mostraram resistência a este, enquanto 22 apresentaram sensibilidade.

A Tobramicina foi testada em 31 pacientes. Destes apenas 5 apresentaram resistência, sendo 2 com valores elevados de Proteína C reactiva e 3 com valores normais desta.

A associação Trimetoprim + Sulfametoxazol foi testada em 70 pacientes. Destes, 69 apresentaram resistência, sendo 33 com valores elevados de Proteína C reactiva e 36 com valores normais desta. Apenas 1 paciente evidenciou sensibilidade a este.

Relativamente à Levofloxacina, em 15 pacientes apenas 4 mostraram resistência, enquanto os restantes 11 eram sensíveis.

A Nitrofurantoína foi utilizada no antibiograma de 20 pacientes. Todos os pacientes apresentaram resistência a esta sendo 6 com valores normais de Proteína C reactiva 14 com valores elevados desta.

A Tigeciclina foi testada em 14 pacientes e todos apresentaram resistência a esta, sendo 9 com valores normais de Proteína C reactiva e 5 com valores elevados desta.

No que respeita à Cefpodoxima, em 12 pacientes testados, todos apresentaram resistência a esta sendo 8 com valores normais de Proteína C reactiva e 4 com valores elevados desta.

Na associação Piperacilina + Tazobactam, em 59 pacientes, apenas 12 apresentaram sensibilidade, os restantes 47 pacientes apresentaram resistência sendo que 25 pacientes apresentam valores normais de Proteína C reactiva e 22 valores acima dos normais desta.

A Tetraciclina foi utilizada em 10 pacientes e todos eles evidenciaram resistência a esta sendo 8 com valores normais de Proteína C reactiva e 2 com valores acima do normal desta.

A Cefoxitina foi aplicada no antibiograma de 27 pacientes. Destes, todos apresentaram resistência a esta sendo 12 com valores acima do normal de Proteína C reactiva e 15 com valores normais desta.

O Imipenem foi testado em 34 pacientes, destes apenas 7 apresentaram resistência a este sendo 3 com valores elevados de Proteína C reactiva e 4 com valores normais desta.

No que respeita ao Aztreonam, em 20 pacientes, 14 apresentaram resistência sendo 5 com valores normais de Proteína C reactiva e 9 com valores elevados desta. Os restantes 6 apresentaram sensibilidade a este.

A Cefepima foi utilizada em 15 pacientes. Destes, 8 apresentaram resistência sendo 2 com valores normais de Proteína C reactiva e 6 com valores elevados desta.

A Minociclina foi aplicada em 26 pacientes, os quais apresentaram todos resistência a esta. Destes 10 têm valores de Proteína C reactiva normais e 16 têm valores elevados desta.

Na Pefloxacina, em 26 pacientes nos quais foi aplicada apenas 14 apresentaram resistência dos quais 5 têm valores normais de Proteína C reactiva e 9 valores acima do normal desta.

A Piperacilina foi utilizada em 12 pacientes dos quais 6 apresentaram resistência. Destes apenas 2 têm valores normais de Proteína C reactiva enquanto 4 têm valores acima do normal desta.

A Ticarcilina fo aplicada em 10 pacientes sendo 7 resistentes. Destes apenas 2 têm valores de Proteína C reactiva normais sendo os restantes 5 com valores acima do normal.

Relativamente à Ticarcilina + Ácido Clavulânico, esta associação foi utilizada no antibiograma de 25 pacientes, apresentando 12 resistência e 13 sensibilidade. Dos resistentes 4 têm valores normais de Proteína C reactiva e 8 valores acima do normal.

A Colistina foi testada em 19 pacientes. Destes 5 apresentaram resistência sendo 3 com valores normais de Proteína C reactiva e 2 com valores acima do normal.

No que respeita à Isepamicina, esta foi testada em 11 pacientes dos quais 9 mostraram ser sensíveis e 2 resistentes. Dos 2 resistentes ambos têm valores elevados de Proteína C reactiva.

A Norfloxacinina foi testada em 27 pacientes dos quais 8 apresentaram resistência sendo 5 com valores normais de Proteína C reactiva e 3 com valores elevados desta.

Estes dados encontram-se descritos no Gráfico 7.

Fagoterapias para infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes

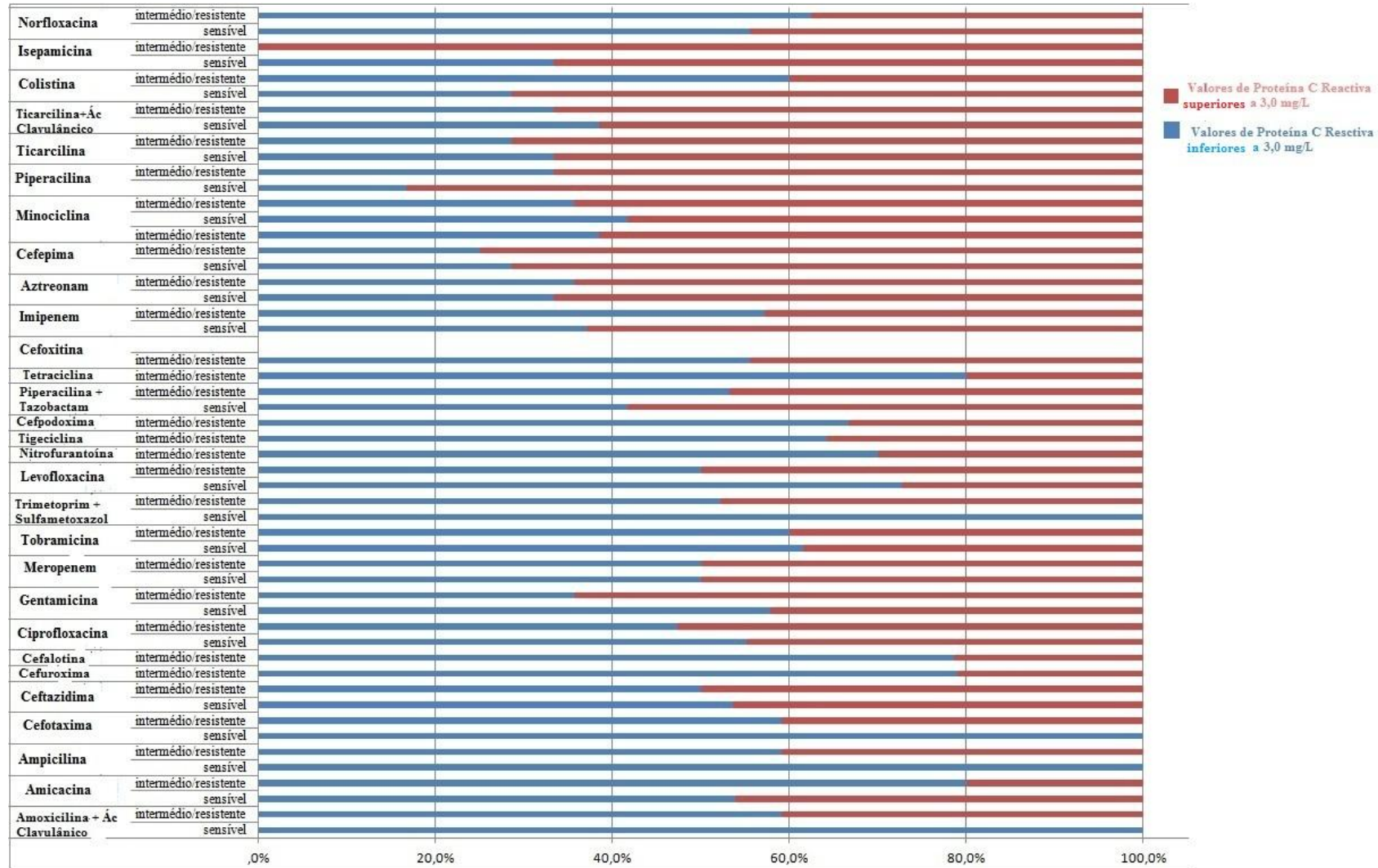


Gráfico 7 – Relação entre a Resistência/Sensibilidade a antibacterianos e os valores altos ou baixos de Proteína C reactiva.

3.2. Resultados Laboratoriais

3.2.1. Transformação bacteriana

A transformação bacteriana envolveu várias etapas devido aos resultados não satisfatórios que foram sendo obtidos. Na 1.^a vez, as placas surgiram sem fluorescência e crescimento exacerbado (possível contaminação) (figura 10A). Na 2.^a vez, surgiram igual à primeira vez. A 3.^a vez envolveu um crescimento bacteriano sem fluorescência quer em *E. coli* quer em *P. aeruginosa*. Na 4.^a vez, apareceu uma fluorescência e um crescimento bacteriano normal (figura 10B).

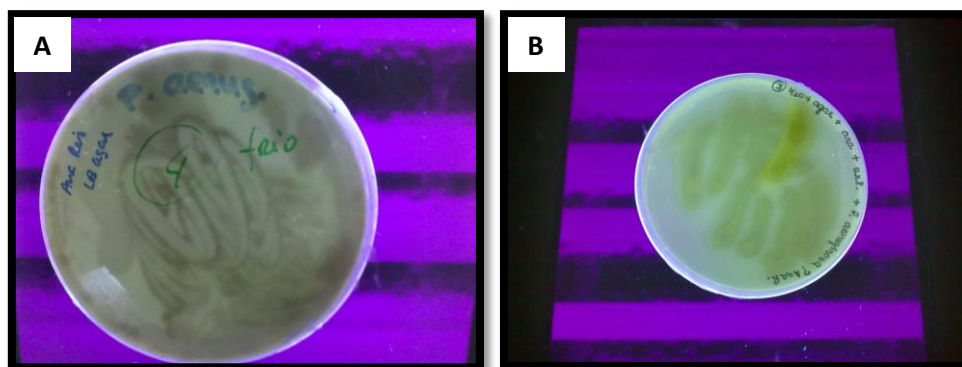


Figura 10 – Transformação: A) estirpe original (ausência de fluorescência e meio sem antibiótico) B) estirpe transformada (presença de fluorescência em meio com antibiótico).

3.2.2. Teste da Nitrocefina

Sabe-se que algumas bactérias são capazes de produzir enzimas que inativam os antibacterianos β -lactâmicos. Algumas hidrolisam as cefalosporinas e chamam-se cefalosporinases e outras as penicilinas e denominam-se penicilinases. Existem bactérias que possuem enzimas capazes de hidrolisar quer cefalosporinas quer penicilinas. Um teste à β -lactamase rápido pode ser concretizado e ceder informação relevante mais rápida que um exame microbiológico. Os testes clínicos existentes detectores de β -lactamases são o método acidométrico, o método iodométrico e os substratos cromogénicos. O teste da Nitrocefina pretence ao método cromogénico. A nitrocefina é uma cefalosporina cromogénica usada para testar *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Staphylococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., e algumas bactérias anaeróbias, e é efectiva na detecção de todas as β -lactamases conhecidas. Os discos usados estão impregandos com nitrocefina. Assim que a ligação amida no anel β -lactâmico é hidrolizada pela β -lactamase, a nitrocefina muda de cor de amarelo a vermelho. As bactérias que produzam β -lactamases em quantidades significativas desenvolvem esta alteração de cor de amarelo a vermelho. Estas β -

lactamases são capazes de inactivar, por exemplo, a amoxicilina, a penicilina, a ampicilina, a piperacilina, entre outros antibacterianos.

Os resultados obtidos foram indicadores de transformação concretizada. Usou-se um controlo de bactéria não transformada para se distinguir a alteração de cor da não alteração de cor (ver figura 11).



Figura 11 – Teste da Nitrocefina: o disco da esquerda apresenta alteração de cor (bactérias transformadas) e o disco da direita não apresenta alteração de cor significativa (bactérias não transformadas).

3.2.3. Reacção PCR

A Reacção em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica da Biologia Molecular que permite replicar *in vitro* o DNA de modo rápido. Com esta técnica, as quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas em milhões de vezes em poucas horas, permitindo uma detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos em estudo.

O PCR decorre em três passos os quais em conjunto se designam como um ciclo, o qual se repete um número específico de vezes. Estes três passos envolvem a Desnaturação, a Hibridização ou *Annealing* e a Extensão.

O termociclador automaticamente controla e alterna as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR (normalmente entre 30-40 ciclos).

Relativamente ao primeiro passo, a Desnaturação térmica, envolve uma temperatura elevada (geralmente > 90°C) à qual a cadeia dupla de DNA separa-se em dois filamentos, denominando-se de “desnaturação”. Os dois filamentos ou cadeias de DNA são mantidos (as) juntos (as) por pontes de hidrogénio, as quais, por serem relativamente fracas, quebram-se a altas temperaturas, ao passo que as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, por serem ligações covalentes mais fortes, permanecem intactas.

O objectivo da PCR não é replicar a cadeia inteira de DNA, mas apenas replicar a sequência de interesse. O segundo passo, a Hibridização ou *Annealing*, envolve os iniciadores, ou *primers*, os quais marcam as extremidades da sequência alvo: estes iniciadores são curtas sequências sintéticas de nucleótidos, entre 20 e 30 bases. Numa reacção de PCR são utilizados dois *primers*, um para cada cadeia simples de DNA que foi produzida durante o passo de desnaturação. O início da sequência do DNA alvo é marcado pelos *primers* que se hibridizam, i.e., ligam-se, com a sequência complementar. A Temperatura de *annealing* ou de hibridização, normalmente, situa-se entre os 40°C e os 65°C, dependendo do comprimento dos *primers* e da sua sequência. A escolha criteriosa desta temperatura permite que estas sequências iniciadoras se liguem à sequência alvo com uma especificidade elevada.

No terceiro passo, a Extensão, após a ligação dos *primers* ou iniciadores às sequências complementares de DNA, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72°C e ocorre replicação da cadeia de DNA por acção da enzima Taq polimerase. A Taq polimerase é uma polimerase de DNA termo-estável recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que, ao contrário de outras polimerases, se mantém activa a temperaturas elevadas. O processo de síntese é iniciado numa zona com dupla cadeia, na qual estão ligados os *primers*, incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTPs em solução. A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'.

No final do primeiro ciclo de PCR encontramos duas novas cadeias de DNA idênticas à original.

No ponto final, a DNA polimerase não reconhece o final da sequência. Assim, as novas cadeias sintetizadas têm o seu início definido pelo *primer*, mas a sua extremidade 3' não está definida, podendo haver fragmentos de diferentes tamanhos. No entanto, no ciclo seguinte, esta cadeia irá servir de molde à síntese de uma nova cadeia, limitando o *primer* a outra extremidade da cadeia. A cadeia de DNA, sintetizada a partir deste molde, terá então o comprimento definido, com os limites definidos pelos *primers*. Estas cadeias chamam-se *Amplicons*. Após alguns ciclos, as cadeias de DNA, que correspondem ao tamanho exacto da sequência alvo, estão presentes num número muito maior do que as sequências de comprimento variável. Por outras palavras, a sequência flanqueada pelos iniciadores ou *primers* é a secção do DNA que se amplifica, neste caso a do gene pGLO.

O PCR foi utilizado para determinar a presença do gene que confere resistência a antibacterianos, pGLO. A existência de bandas altamente inespecíficas evidenciava a necessidade de ajustar as condições de PCR. Os resultados obtidos não foram conclusivos. Como poderia demorar desde dias a semanas ou até mesmo a meses até otimizar as condições optou-se por recorrer ao estudo estatístico deixando este num progresso mais lento (ver figura 12).

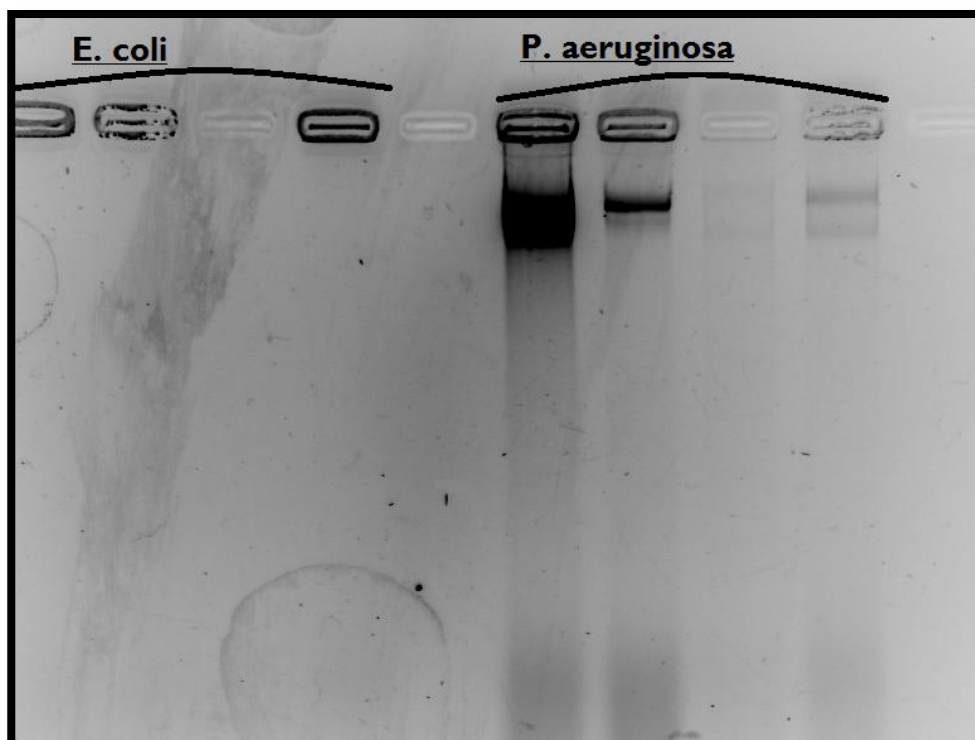


Figura 12 – Gel de electroforese: é possível verificar que existe DNA nos poços e que as bandas presentes são altamente inespecíficas sendo necessário otimizar as condições de PCR. Analisou-se o DNA de *E. coli* e de *P. aeruginosa*.

4. Discussão /Conclusão

Segundo os resultados obtidos a amostra em estudo apresenta idades envelhecidas pois 50% dos pacientes têm idades superiores a 78,5 anos o que deve-se ao facto de serem idades mais susceptíveis a doença e consequentemente a internamentos, pelo seu sistema imunitário mais débil (DGS, 2004).

Nos internamentos verificou-se um predomínio do sexo feminino sobre o masculino pois existem mais mulheres do que homens sendo maior a probabilidade de uma mulher adoecer e ficar internada. Estudos têm demonstrado que as mulheres apresentam maiores necessidades de cuidados de saúde do que os homens (Artur et Fachada, 2004).

Apesar de haver um grande número de pacientes envelhecidos, a percentagem de diabéticos é inferior à de não diabéticos, logo a idade não parece ter influência para os valores mais altos ou mais baixos de glicose. No entanto sabe-se que a partir dos 35 anos é mais frequente a Diabetes do tipo II (NDSS, 2011). No gráfico traçado é possível verificar que existe uma relação entre a idade e os valores de glicose no sangue.

Relativamente aos serviços de internamento, os serviços com maior número de pacientes são os Serviços de Medicina (Adultos, Pediatria, ...), seguindo-se o serviço de Cirurgia. Segundo a bibliografia consultada os Cuidados intensivos seriam os serviços com maior número de pacientes com infecção por *P. aeruginosa*, seguindo-se da Medicina e por último a Cirurgia. Com estes resultados pode-se afirmar que tem havido um aumento no número de pacientes com infecções por esta bactéria nos serviços de Medicina e Cirurgia sendo necessário estar alerta pois é indicador de um agravamento ou descuido relativamente às condições de limpeza quer da equipa quer do próprio equipamento (Pina et al, 2009).

No que diz respeito aos resultados relativos à relação entre a idade e a resistência/sensibilidade a antibacterianos não foi possível encontrar uma relação, no entanto sabe-se que existe uma relação. Quando mais avançada for a idade menor é a sensibilidade aos antibacterianos pelo facto de ao longo da vida já ter estado em contacto com um maior número de antibacterianos. Seria necessário expandir o número da amostra para ser possível tirar mais conclusões (Ribeiro, M. et Pinto, I. (2009)).

Os locais de infecção mais comuns desde 2001 até 2009 são as Infecções Respiratórias. Em 2001 estas eram seguidas pelas Septicémias. Em 2002 estas

seguiram-se pelas Infecções urinárias, Infecções de Tecidos Moles e por último pelas Septicémias. Em 2007 estas seguiram-se pelas Infecções urinárias, Infecções gastrointestinais e pelas Septicémias (Pina et al, 2009). No presente estudo piloto, referente a 2011, o local de infecção mais comum continuou a ser as Infecções respiratórias, seguidas das Infecções urinárias, das Infecções dos tecidos moles e por último as Septicémias. Foi possível verificar que mantêm-se as mais comuns, Infecções Respiratórias e Urinárias, mas com uma diminuição na frequência. As menos comuns, Infecções tecidos moles e Septicémias, mantêm-se como menos comuns mas apresentam um aumento na sua frequência, o que significa que será necessária atenção redobrada sobre estes pacientes.

Relativamente à resistência a antibacterianos e os valores de glicose, diabético/não diabético, em todos os pacientes que apresentaram sensibilidade aos diversos antibacterianos testados existem diabéticos e nem em todos os pacientes que apresentaram resistência a estes existem diabéticos, a presença/ausência de diabetes, segundo o presente estudo, não tem qualquer influência na resistência/sensibilidade aos antibacterianos. Por exemplo, a Colistina apresenta um maior número de pacientes diabéticos resistentes a esta, acontecendo o mesmo com a Levofloxacina, mas a Ticarcilina apresenta um maior número de pacientes diabéticos no grupo dos pacientes que mostraram sensibilidade a esta. A existência de poucos estudos que relacionem as duas variáveis dificultou o estudo por não haver um termo de comparação. Apesar de tudo, reconhece-se que os pacientes diabéticos apresentam uma maior frequência de infecções em relação aos pacientes não diabéticos. Desta forma tomam mais frequentemente antibacterianos podendo desenvolver mais facilmente resistência a estes. No entanto, alguns estudos dizem que a diabetes por si só não é um factor causal para a resistência a antibacterianos (Meiland et al, 2004).

Os valores da Proteína C Reactiva também demonstraram não ter qualquer influência na resistência/sensibilidade a antibacterianos pois em todos os pacientes que mostraram ser sensíveis aos antibacterianos existem valores elevados desta, assim como em todos os que mostraram ser resistentes aos antibacterianos. Por exemplo, A Isepamicina apresenta elevadas percentagens de pacientes com valores de PrCR elevados quer em pacientes que mostraram sensibilidade a esta quer nos que mostraram resistência. Do mesmo modo acontece na Ticarcilina e Ticarcilina + Ácido Clavulânico, na Piperacilina, Minociclina, Cefepima e Aztreonam. A proteína C reactiva é indicadora

de infecção no organismo mas não foi encontrado qualquer estudo que atribua uma associação dos valores desta ao facto de o paciente ser ou não resistente aos antibacterianos (NIH, 2011).

Segundo uma notícia publicada no Jornal de Notícias a 5 de Setembro do corrente ano, Portugal revelou uma taxa de infecções hospitalares superior à média mundial. A média nacional atingiu os 11% enquanto a média total foi de 2,6%. Dos pacientes internados 20% apresentavam mais de 85 anos (Tavares, 2011).

Segundo o Diário da República n.º 49 Série I Parte A de 27/02/2001, Decreto-Lei n.º 76/2001 de 27/02/2001, capítulo III – Órgãos e competências, secção VI – Órgãos de apoio técnico, artigo 32º - Comissão de controlo da infecção hospitalar, “*a comissão de controlo da infecção hospitalar é presidida por um adjunto do director clínico, competindo-lhe o estudo e a apresentação de medidas de prevenção e combate à infecção hospitalar*” (Diário da República, 2001).

O hospital em estudo apresenta um sistema de vigilância com uma política de controlo de infecções hospitalares, impostos pela Comissão de controlo da infecção hospitalar. Este hospital contém uma carta ecológica bacteriana e a equipa contém, entre outros, um epidemiologista e um biólogo.

Tendo em consideração que 91,67% dos pacientes em estudo manifestou resistência a mais do que 3 classes de antimicrobianos, torna-se realmente urgente o uso controlado de antibacterianos e a pesquisa de novas terapêuticas em alternativa a estes de modo a evitar e a controlar as resistências bacterianas aos antibacterianos disponíveis neste momento no mercado.

5. Perspectivas Futuras

O aumento crescente da resistência a antibacterianos aumentou a necessidade de uma pesquisa intensa de novas terapêuticas em alternativa à antibioterapia.

A partir do estudo realizado a pesquisa laboratorial, a qual por falta de tempo ficou pela parte da transformação bacteriana, teria ainda como passo seguinte a utilização de bacteriófagos em culturas bacterianas de modo a avaliar a velocidade e a densidade do crescimento bacteriano.

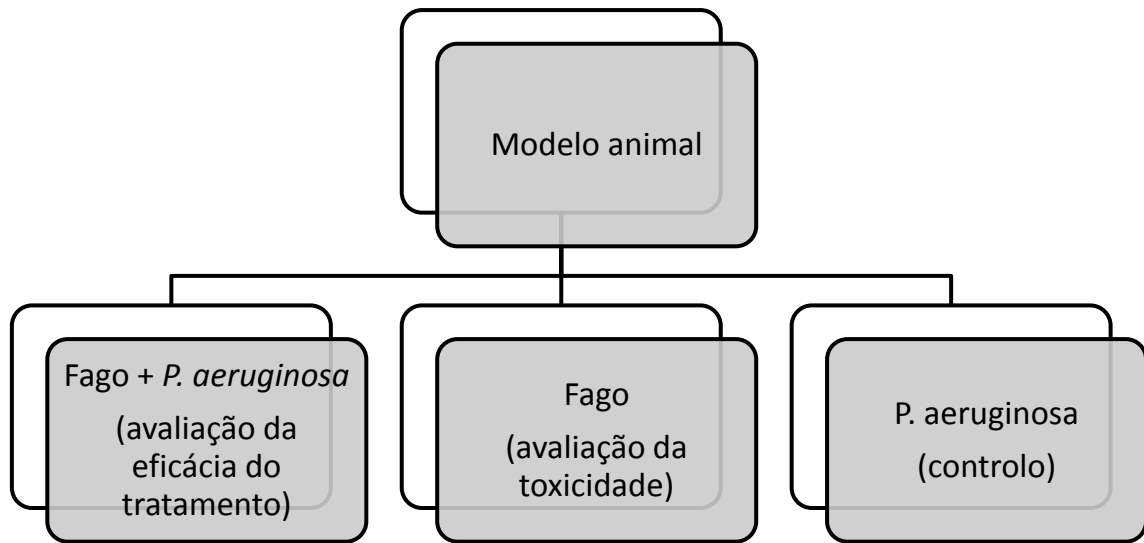
Primeiramente seria necessário caracterizar o crescimento do bacteriófago descrevendo o seu ciclo infeccioso e para tal determinando a fase latente e *burst size*.

Segundo Kutter e Sulakvelidze (2004), é melhor infectar a bactéria numa fase de crescimento exponencial para obter células metabolicamente activas. O *burst size* descreve o número médio de fagos libertados pela célula bacteriana (Kutter e Sulakvelidze, 2004).

O próximo passo seria determinar a fase de desenvolvimento bacteriano ideal para aplicação da fagoterapia nas culturas bacterianas. Determinar qual o pico do seu crescimento e aplicar a fagoterapia de forma a verificar se seria esse o melhor método de aplicação da terapêutica. Para tal as culturas bacterianas transformadas ficariam em crescimento em meio líquido sendo sujeitas a análise da densidade óptica de hora em hora de modo a traçar a curva do seu crescimento. Depois de traçadas as curvas de crescimento bacteriano aplicam-se os fagos no ponto do crescimento exponencial.

Após vários testes de forma a determinar a eficácia *in vitro* da fagoterapia no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* transformada, ou seja resistente, passar-se-ia para a fase da utilização do modelo animal.

Utilizar-se-iam modelos animais fêmea aos quais seria causada uma ferida cutânea e infectada por *P. aeruginosa* transformada. A composição do *cocktail* de *P. aeruginosa* seria de 100 µL de *inoculum* (2×10^2 a 3×10^2 CFU). De seguida analisar-se-ia o desenvolvimento da infecção. Uns modelos animais iriam ser tratados com uma preparação farmacêutica (pomada) com fagos, enquanto outros iriam servir para estudar a evolução da infecção de modo a determinar a durabilidade dos modelos infectados para um controlo, e ainda outros seriam usados para determinar a toxicidade dos fagos no nosso organismo. O diagrama seguinte descreve a distribuição dos diferentes modelos animais durante o estudo.



A pomada utilizada iria ter em conta, primeiramente, a composição do *cocktail* de fagos, o qual teria que ter uma concentração de $3,0 \times 10^8$ PFU total. Depois seria envolvido numa pomada composta por vaselina pura e parafina *qbp* de forma a ser melhor absorvida pela pele. A sua aplicação poderia ser igualmente numa gaze impregnada por este *cocktail*.

6. Bibliografia

1. Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzario, A.I, Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini, G. M.(1999). Cloning and Characterization of *bla*_{VIM}, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(7), 1584 -1590.
2. Struble, J. M. and Gill, R. T. (2009). Genome-Scale Identification Method Applied to Find Cryptic Aminoglycoside Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 4(11): e6576.
3. Hirakawa, Y., Sasaki, H., Kawamoto, E., Ishikawa, H., Matsumoto, T., Aoyama, N., Kawasumi, K., and Amao, H. (2010). Prevalence and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in chinchillas. *BMC Vet Res*, v.6: 52.
4. Tsakris, A., Poulou, A., Kristo, L., Pittaras, T., Spanakis, N., Pournaras, S., and Markou, F. (2009). Large Dissemination of VIM-2-Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Health Care-Associated Community-Onset Infections. *J Clin Microbiol.*, 47(11): 3524 – 3529.
5. Ding, J.-G., Sun, Q.-F., Li, K.-C., Zheng, M. – H., Miao, X.-H., Ni, W., Hong, L., Yang, J.-X., Ruan, Z.-W., Zhou, R.-W., Zhou, H.- J., and He, W.-F. (2009). Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *BMC Infect Dis*, v.9.
6. Onguru, P., Erbay, A., Bodur, H., Baran, G., Akinci, E., Balaben, N., and Cevik, M. A. (2008). Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors for Nosocomial Infections. *J Korean Med Sci.*, v.23(6): 982-987.
7. Tam, V. H., Chang, K.-T., Abdelraouf, K., Brioso, C. G., Ameka, M., McCaskey, L. A., Weston, J. S., Caeiro, J. P., and Garey, K. W. (2010). Prevalence, Resistance Mechanisms, and Susceptibility of Multidrug-Resistant Bloodstream Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.54(3): 1160-1164.
8. Hirsch, E. B., and Tam, V. H. (2011). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.*, 10(4): 441-451.
9. Lo, T. S., Borchardt, S. M., Welch, J. M., Rohrich, M. A., Alonto, A. M., and Alonto A. V. (2009). Doripenem in hospital infections: a focus on nosocomial pneumonia, complicated intra-abdominal infections, and complicated urinary tract infections. *Infect Drug Resist.*, v.2: 41-49.
10. Baumann,U., Gocke, K., Gewecke, B., Freihorst, J., and von Specht, B. U. (2007). Assessment of pulmonary antibodies with induced sputum and bronchoalveolar lavage induced by nasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical phase I/II study. *Respir Res*, v.8 (1): 57.

11. Scarff, J. M., and Goldberg, J. B. (2008). Vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Immunocompromised Mice. *Clin Vaccine Immunol*, v.15 (2): 367-375.
12. Pina, E., Silva, M. G., da Silva, E. G., Uva, A. De S. (2009). Infecção relacionada com a prestação de cuidados de saúde: infecções da corrente sanguínea (septicemia). *Revista Portuguesa de Saúde Pública: Infecções nosocomiais*, vol.28, nº 1 – Janeiro/Junho 2010.
13. Kropinski, A. M. (2006). Phage Therapy – Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, v.17(5): 297-306.
14. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, Jr. J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(3): 649-659.
15. NDSS (National Diabetes Services Scheme) (2011). Type 2 Diabetes. *Diabetes Australia*, 07/09/2011.
16. Artur, P. S., Fachada, M. (2004). O estado de saúde dos portugueses. Uma perspectiva espacial. *Revista de Estudos Demográficos*, n.º 36, (pág. 12).
17. DGS (Direcção Geral de Saúde) (2004). Programa Nacional para a Saúde das Pessoas Idosas. *Circular Normativa n.º 13*, (págs. 1, 3 e 5).
18. RIBEIRO, M., PINTO, I. (2009) Comportamento da população do concelho de Vizela no consumo de antibióticos. *Rev. Port. Sau. Pub.*, Jul. 2009, vol.27, no.2, p.57-70.
19. NIH (National Institutes of Health) (2011). C-Reactive Protein. *Medline Plus*, MD 20894.
20. Meiland R., Geerlings S. E., De Neeling A. J., Hoepelman A. I. (2004). Diabetes mellitus in itself is not a risk factor for antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from patients with bacteriuria. *Department of Acute Medicine & Infectious Diseases, University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands*, Sep; 21(9):1032-4.
21. Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219):1899-902.
22. Piddock, L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 19(2):382-402.
23. Zihra-Zarif, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J.C., Plesiat, P. (1999). *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(2):287-91.
24. Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S, Heinrichs, D. E., Bianco, N. (1996). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(9):2021-8.
25. Poole, K. (2001). Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3(2): 255-264.

26. Fraud, S., Poole, K. (2010). Oxidative Stress Induction of the MexXY Multidrug Efflux Genes and Promotion of Aminoglycoside Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3): 1068–1074.
27. Mingeot-Leclecq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4): 727–737.
28. Livermore, D. M. (1992). Interplay of impermeability an chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36(9):2046-8.
29. Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5):962-9.
30. Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 52(4):699-702.
31. Freeman, J., Wilcox, M. H. (2001). Ureidopenicillins and risk of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother*, 47(5):719.
32. Khaleghi M, Kasra Kermanshahi R, Zarkesh-Esfahani SH (2011). Effects of penicillin G on morphology and certain physiological parameters of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J Microbiol Biotechnol*, 21(8):822-9.
33. Ellison, S. J. (2009). The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses – a review. *Br Dent J*, (7):357-62.
34. Kurochkina, V. B., Skyarenko, A. V., Satarova, J. E., Yarotsky, S. V. (2011). Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicilins and aminocephalosporins. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34(9):1103-17.
35. Verdon, E., Couedor, P. (1998). Determination of isoxazolympenicillins residues in milk by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 705(1):71-8.
36. Manuel, J., Zhanel, G. G., de Kievit, T. (2010). Cadaverine suppresses persistence to carboxypenicillins in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12):5173-9.
37. Zhao, M., Chu, Y.Z., Wan, J.H., Baj, Y.L., Zhang, J.P., Li, J.B., Wang, X., Wang, Q., Li, L.Y., Chen, B.Y. (2007). Replacement of third-generation cephalosporins by piperacillin-tazobactam decreases colonization of extended-spectrum beta-lactamases-producing intestinal *Escherichia coli*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 46(9):714-7.
38. Petrikos G, Markogiannakis A, Papaparaskevas J, Daikos GL, Stefanakos G, Zissis NP, Avlami A. (2007). Differences in the changes in resistance patterns to third- and fourth-

generation cephalosporins and piperacillin/tazobactam among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates following a restriction policy in a Greek tertiary care hospital. *Int J Antimicrob Agents*, 29(1):34-8.

39. Quintiliani, R., French, M., Nightingale, C.H. (1982). First and second generation cephalosporins. *Med Clin North Am*, (1):183-97.

40. Cook, P.P., Gooch, M., Rizzo, S. (2011). Reduction in fluoroquinolone use following introduction of ertapenem to hospital formulary associated with improvement in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to group 2 carbapenems: a 10-year study. *Antimicrob Agents Chemother*, Epub ahead of print.

41. Honderlick, P., Gravisse, J., Dardelle, D., Cahen, P. (2007). [Is aztreonam could become "a challenger" for treatment of Gram negative infections? May be an answer from microbiological data: in vitro study including 36,485 strains of enterobacteria and *Pseudomonas*]. *Pathol Biol (Paris)*, 55(10):475-7.

42. Tavares, M. (2011). Portugal com taxa de infecções hospitalares superior à média mundial. *Jornal de Notícias, Sociedade* 05-09-2011.

43. Diário da República (2001). Diário da República nº 49 Série I Parte A de 27/02/2001 - Decreto-Lei nº 76/2001 de 27-02-2001- CAPÍTULO III - Órgãos e competências - SECÇÃO VI - Órgãos de apoio técnico - Artigo 32.º - Comissão de controlo da infecção hospitalar. *Base de dados Jurídica Almedina*, Início de Vigência: 04-03-2001.

44. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Publisher: CRC. 28-12-2004. ISBN: 0849313368. 528 pages. Capítulo 3.