



Estudo comparativo entre antibióticos de origem natural e semissintética da família das penicilinas em bactérias Gram positivo

João Pedro Afonso Rodrigues

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Professora Doutora Maria Helena Pimentel

Coorientado por

Maria José Lopes Montanha

Madalena Maria Pereira Alves

Bragança

2013

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas e instituições às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento:

À Professora Doutora Helena Pimentel, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela revisão crítica do texto, pelos profícuos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões.

À Doutora Maria José Montanha e Doutora Madalena Alves, pela disponibilidade para me orientar este trabalho, pelos conselhos, opiniões, sugestões e cedência de bibliografia relevante para os estudos em análise.

Ao Professor Doutor Jorge Morais que pela nossa amizade se disponibilizou a dar valiosas indicações de como elaborar uma tese, metodologias utilizadas, incitando-me a nunca desistir.

Aos meus colegas que me ajudaram a conseguir ter êxito na parte curricular do mestrado, pela sua compreensão.

À Unidade Hospitalar de Bragança da ULSNE, pela cedência de dados utilizados no estudo.

Por último mas não menos importante, aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio e compreensão inestimável.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE QUADROS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
RESUMEN	XII
1. INTRODUÇÃO	pág. 1
1.1. Classificação de bactérias segundo a coloração de Gram	pág. 1
1.2. O género <i>Enterococcus</i>	pág. 2
1.3. <i>Enterococcus</i> e sua resistência bacteriana	pág. 4
2. ANTIBIOTERAPIA	pág. 5
2.1. Classificação dos antibióticos segundo a ação nas bactérias	pág. 5
2.2. Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação	pág. 5
2.3. Classificação dos antibióticos segundo a estrutura química	pág. 6
3. ANTIBIÓTICOS β- LACTÂMICOS	pág. 7
3.1. História dos Antibióticos β - lactâmicos	pág. 7
3.2. Penicilinas	pág. 8
3.2.1. <i>Classificação das penicilinas</i>	pág. 9
3.2.2. <i>Mecanismo de ação da penicilina</i>	pág. 11
3.2.3. <i>Penicilina G</i>	pág. 12
3.2.4. <i>Ampicilina</i>	pág. 13

4. AVALIAÇÃO DOS CRESCIMENTO BACTERIANO – CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	pág. 15
5. OBJETIVO GERAL	pág. 17
5.1. Objetivos específicos	pág. 17
6. MATERIAL E MÉTODOS	pág. 18
6.1. Tipo de estudo	pág. 18
6.2. Amostra de estudo	pág. 18
6.3. Procedimentos	pág. 18
6.3.1. <i>Isolamento e identificação das bactérias</i>	pág. 18
6.3.2. <i>Testes de sensibilidade</i>	pág. 22
6.4. Procedimentos estatísticos	pág. 23
7. RESULTADOS	pág. 25
8. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	pág. 33
9. CONCLUSÃO	pág. 38
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pág. 39
11. ANEXOS	pág. 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da penicilina que mostra o anel β-lactâmico.	pág. 8
Figura 2. Estrutura química penicilina G.	pág. 13
Figura 3. Estrutura química da ampicilina.	pág. 14
Figura 4. Meio de cultura CLED e amostra de urina.	pág. 20
Figura 5. Meios de cultura GS, GC, BH, Manitol, Mackonkey e amostras de pús, líquido biológico e ponta de cateter.	pág. 20
Figura 6. Meios de cultura GS, GC, Manitol, Mackonkey, Saboround e amostras de hemocultura e expetoração.	pág. 21
Figura 7. Determinação da CMI pelo método de Broth Dilution.	pág. 22
Figura 8. Caraterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para a amostra total (%).	pág. 25
Figura 9. Caraterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para o género masculino (%).	pág. 25
Figura 10. Caraterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para o género feminino (%).	pág. 26
Figura 11. Percentagem de utentes infetados por bactéria para a amostra total.	pág. 26
Figura 12. Percentagem de utentes infetados por bactéria para o género masculino.	pág. 27

Figura 13. Percentagem de utentes infetados por bactéria para o género feminino. pág. 27

Figura 14. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. Faecalis* ($p < 0,001$) em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para a amostra total. (género: $p > 0.05$) pág. 28

Figura 15. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. Faecalis* ($p < 0.001$), em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para o género masculino. pág. 29

Figura 16. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. faecalis* ($P < 0.001$), em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para o género feminino. pág. 29

Figura 17. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($P > 0,05$) para a amostra total (género: $p > 0.05$). pág. 31

Figura 18. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($p > 0.05$) para o género masculino. pág. 31

Figura 19. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($p > 0.05$) para o género feminino. pág. 32

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das penicilinas de acordo com a origem e espectro de ação.	pág. 10
Quadro 2. Procedimentos para o tratamento de produtos biológicos no Setor de Microbiologia da Unidade Hospitalar de Bragança.	pág. 19
Quadro 3. Antibióticos em estudo da CMI.	pág. 23
Quadro 4. Anova 2 fatores para ampicilina e penicilina.	pág. 30

ABREVIATURAS

BH – Brain Heart

CAMHB – Cation – Adjusted Muller – Hinton Broth

CA – SFM – Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLED – Cysteine Lactose Electrolyte Deficient

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EUSCAST – European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA – Food and Drug Administration

GC – Gelose de Chocolate

GS – Gelose de Sangue

GP – Gram Positivo

LPS – Lipopolissacarídeo

MC – Membrana Citoplasmática

MHA – Muller-Hinton Agar

ml – Mililitros

µg – Picogramas

µl - Microlitro

NaCl- Cloreto de Sódio

PBPs - Penicillin Binding Proteins

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal

ULSNE – Unidade Local de Saúde do Nordeste

RESUMO

As infecções nosocomiais são um problema de Saúde Pública e encontram-se associadas a uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Com o avanço da medicina e um aumento do uso em grande escala de antibióticos o padrão das infecções nosocomiais tem mudado com os anos tendo estas infecções adquirido novas resistências aos antibióticos. Entre as bactérias causadoras de doenças nosocomiais encontra-se o Género *Enterococcus*, sendo este um dos agentes mais importantes causadores deste tipo de doença. A presente tese teve com o principal objetivo comparar o efeito antibacteriano de dois antibióticos: (i) um natural (penicilina G) e;(ii) um semissintético (ampicilina). O efeito antibacteriano foi analisado em bactérias Gram positivo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* para a amostra total, de acordo com o género. A amostra foi composta por 314 utentes (162 do género masculino: $68,49 \pm 21,59$ anos de idade e; 152 do género feminino: $61,15 \pm 23,04$ anos de idade) da Unidade Hospitalar de Bragança da ULSNE. As amostras biológicas em que se isolaram bactérias do género *Enterococcus* foram: (i) urina; (ii) pús; (iii) líquido biológico; (iv) hemoculturas; (v) expetoração e; (vi) cateter. Para averiguar o efeito antibacteriano foi determinada a Concentração Mínima Inibitória dos antibióticos alvo de estudo. Os principais resultados revelaram que a maior parte dos *Enterococcus* isolados das amostras biológicas foram da espécie *faecalis* (82%) e os restantes (18%) da espécie *faecium*. Observou-se um efeito significativo da bactéria, visto que foram observadas diferenças entre a sensibilidade e resistência entre a espécie *faecium* e *faecalis*. De uma forma geral, e no que diz respeito à resistência, ambos os antibióticos mostraram-se mais resistentes à espécie *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5% para a amostra total) do que em relação à espécie *faecalis* (penicilina G: 33,5%; ampicilina: 33,5% para a amostra total). Já em relação à sensibilidade registou-se o inverso. Os dois antibióticos mostraram-se mais sensíveis à espécie *faecalis* (penicilina G: 66,5%; ampicilina: 66,5% para a amostra total) relativamente à espécie *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5% para a amostra total). Quando analisado por género os resultados da resistência e sensibilidade seguiram a mesma tendência, não havendo resultados em significância estatística em função desta variável. Concluiu-se que para cada espécie não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no efeito antibacteriano entre a penicilina G e ampicilina.

Palavras-chave: efeito antibacteriano, *Enterococcus*, Concentração Mínima Inibitória.

ABSTRACT

Nocosomial infections are a public health issue being also associated to a high mobility and mortality rate. With the medicine innovation and with their high scale administration, the pattern of the nocosomal infections are changing and being more resistant to the antibiotics. Among these nocosomal bacterias the *Enterococcus* Gender is one of the most relevant. The main purpose of this thesis was to compare the antibacterial effect between two antibiotics: (i) a natural one (penicillin G) and; a semi-synthetic one (ampicillin). The antibacterial effect was analyzed in positive Gram *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* for the total sample and also for males and females. The sample was composed by 314 patients (162 males: 68.49 ± 21.59 year old and; 152 females: 61.15 ± 23.04 year old) from the Hospital Unit of Bragança. The biological samples used were: (i) urine; (ii) pus; (iii) biological liquid; (iv) bloodcultures; (v) sputum and; (vi) catheter. The inhibitory minimum concentration was used to observe the antibacterial effect. Main results showed a higher prevalence of the *faecalis* species (82%) in comparison with the *faecium* ones (18%). A bacterial significant effect was showed, as data presented significant differences between the sensibility and resistance between species. Overall, and regarding the resistance, both antibiotics proved to be more resistant to the *faecium* species (penicilin G: 91.2%; ampicilin: 89.5% for total sample) in comparison to the *faecalis* one (penicilin G: 33.5%; ampicilina: 33.5% for total sample). As for the sensibility an inverse trend was observed. Both antibiotics were more sensitive to the *faecalis* specie (penicilin G: 66.5%; ampicilin: 66.5% for total sample) in comparison to the *faecium* one (penicilin G: 91.2%; ampicilin: 89.5% for total sample). For each gender the results followed the same trend, as no significant effect was observed. As main conclusion, it was showed that no significant differences were observed between both antibiotics for both *faecium* and *faecalis* species.

Keywords: antibacterial effect; *Enterococcus*; inhibitory minimum concentration.

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud pública e se encuentran asociadas a una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Con el avance de la medicina y el aumento en el uso a gran escala de antibióticos, el padrón de las infecciones nosocomiales ha ido cambiando con los años, y por consiguiente, estas infecciones han ido adquiriendo nuevas resistencias a los mismos. De entre las bacterias causantes de enfermedades nosocomiales se encuentra el género *Enterococcus*, siendo este uno de los agentes más importantes que originan este tipo de enfermedad. Esta tesis tiene como principal objetivo comparar el efecto antibacteriano de dos antibióticos: (i) un natural (penicilina G) y (ii) un semisintético (ampicilina). El efecto antibacteriano se analizó en bacterias Gram positivos *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, para la muestra total y teniendo en cuenta el género. La muestra constó de 314 pacientes (162 varones: $68,49 \pm 21,59$ años de edad y, 152 mujeres: $61,15 \pm 23,04$ años de edad) de la Unidad Hospitalaria de Bragança. Las muestras biológicas en las que se han aislado bacterias del género *Enterococcus* fueron: (i) orina y (ii) pus (iii) líquido biológico (iv) hemocultivos (v) expectoración, y (vi) catéter. Para investigar el efecto antibacteriano se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos diana del estudio. Los principales resultados evidenciaron que la mayoría de los *Enterococcus* aislados de las muestras biológicas eran de la especie *faecalis* (82%) y el resto (18%) de las especies *faecium*. Se observó un efecto significativo de la bacteria, ya que se encontraron diferencias entre la sensibilidad y la resistencia entre las especies *faecium* y *faecalis*. En general, en lo que concierne a la resistencia, ambos antibióticos se han mostrado más resistentes a las especies *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5% para la muestra total) que para las especies *faecalis* (penicilina G: 33,5%; ampicilina: 33,5% de la muestra total). En cuanto a la sensibilidad se ha verificado la inversa. Los dos antibióticos eran más sensibles a la especie *faecalis* (penicilina G: 66,5%; ampicilina: 66,5% para la muestra total) con relación a la especie *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5% para la muestra total). Cuando separados por género los resultados de sensibilidad y resistencia siguieron la misma tendencia, siendo que el género no ha tenido un efecto significativo. Se concluyó que para cada especie no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el efecto antibacteriano penicilina G y de la ampicilina.

Palabras clave: efecto antibacteriano, *Enterococcus*, concentración mínima inhibitoria.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação de bactérias segundo a coloração de Gram

Os microrganismos procarióticos são organismos unicelulares com uma organização bastante simples, em que o seu material genético não é delimitado por qualquer membrana. Apesar de apresentarem grande diversidade morfológica, a maioria surge numa de duas formas: (i) esférica (cocos) ou;(ii) em forma de bastonete (bacilos) (Brooks et al., 2012).

As bactérias possuem uma parede celular que constitui uma proteção mecânica e eficaz contra a ruptura osmótica, em ambientes hipotónicos. O componente parietal responsável pela rigidez da parede celular é o peptidoglicano. Este componente é uma macromolécula presente em todas as bactérias com parede celular (exceto nas *Archaeobacterias*). O peptidoglicano é essencial para a estrutura da parede celular, na replicação e sobrevivência em condições hostis nas quais as bactérias crescem. Durante uma infeção, o peptidoglicano pode interferir na fagocitose e estimular as respostas imunológicas inatas, incluindo a atividade pirogénica (Nikolaidis *et al.*, 2013).

A parede celular também é responsável pela morfologia bacteriana e pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram. Esta metodologia (i.e. coloração de Gram) tem relevante significado taxonómico pois permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: positivo ao Gram e negativo ao Gram. As bactérias Gram positivo adquirem a cor arroxeadada, conferida pelo corante primário e as Gram negativo coram de vermelho. O diferente comportamento das bactérias face a esta coloração deve-se a estes dois grupos apresentarem parede celular química e estruturalmente distinta (Sousa *et al.*, 1998). A membrana externa é exclusiva das bactérias negativo ao Gram, mantém a estrutura bacteriana e é uma barreira de permeabilidade para moléculas grandes e hidrofóbicas. O seu folheto interno é constituído por fosfolípidos. O folheto externo é composto primariamente de uma molécula anfipática – lipopolissacarídeo (LPS). O LPS, também designado de endotoxina é um estimulador das respostas naturais e imunes (Murray *et al.*, 2006).

As bactérias Gram positivas confinam o corante cristal violeta dentro da sua camada de peptidoglicano que circunda a célula. Estas bactérias (i.e. Gram positivo) não apresentam lípidos e têm abundância em peptidoglicano (cerca de 50-90% do

peso total da parede celular seca). As bactérias Gram negativo, como possuem pouco peptidoglicano não retém o cristal violeta mas sim o segundo corante, a safranina. Por outro lado, as bactérias Gram negativo apresentam um teor elevado em lipídeos sendo a percentagem de peptidoglicano apenas de 10% do peso total da parede celular seca (Sousa *et al.*, 1998). Em suma, as bactérias Gram positivo coram de azul enquanto as Gram negativo coram de vermelho (Murray *et al.*, 2006).

1.2. O Género *Enterococcus*

A aceitação do género *Enterococcus* deu-se em 1984, através de técnicas de biologia molecular como a hibridação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e sequenciamento do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) 16S (Murray, 1990; Moellering, 1992; Kohler, 2007; Ogier *et al.*, 2008). De acordo com os mesmos autores até à data são conhecidas várias espécies de *Enterococcus* sendo as seguintes que tem maior significado clínico: *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*.

Estes cocos fazem parte da microflora intestinal humana, mas também foram descritos como fazendo parte da mucosa oral e vaginal. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são as espécies mais comuns em humanos (Murray, 1990; Ogier *et al.*, 2008). Podem também ser encontrados na microflora de outros animais, alimentos (principalmente em produtos láteos e carnes) e plantas. Quando encontrados no solo ou na água, são, provavelmente, resultado de contaminação por fontes fecais devido à sua tolerância natural a condições adversas (Murray, 1990; Devriese *et al.*, 1991; Facklam *et al.*, 2002; Giraffa, 2002).

O nome “entérocoque” foi pela primeira vez introduzido em 1899 por Thiercelin, de modo a enfatizar a origem intestinal dos diplococos Gram positivos por ele descobertos. Neste género é característico encontrar seres anaeróbios facultativos, que apresentam uma forma ovóide, podendo aparecer como pequenas cadeias, aos pares ou como células únicas e não se apresentam sob a forma de esporos (Murray, 1990; Witte *et al.*, 1999; Kohler, 2007).

São capazes de crescer em condições adversas tais como: (i) temperaturas extremas (entre 5°C a 65°C); (ii) pH variável, entre 4,5 (alcalino) a 10 (ácido) e altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Estes organismos não possuem citocromos e são catalase negativo, porém existem algumas espécies que produzem uma pseudocatalase. Outra característica que os distingue é a capacidade de hidrolisarem compostos como a esculina (Murray, 1990; Moreno *et al.*, 2006).

Os *Enterococcus* são organismos fermentadores restritos devido à inexistência de ciclo de Krebs. Estes são quimio-organotróficos e o seu complexo nutricional requer um meio contendo peptona ou produtos semelhantes para o seu crescimento. São responsáveis por infecções nosocomiais graves, sendo a terceira causa nos Estados Unidos da América e a quarta na Europa (Liu, 2011). Sendo patogénicos emergentes são considerados a segunda causa de infecções urinárias tanto nos EUA como na Europa, e são responsáveis de entre 5 a 20% das endocardites. A taxa de mortalidade de infecções por *Enterococcus* ronda os 20 a 30% (Ogier *et al.*, 2008).

Consideram-se duas as fontes principais de infeção nosocomial por *Enterococcus*: (i) a causada por *Enterococcus* presentes no trato gastrointestinal do próprio paciente; (ii) a adquirida por transmissão no ambiente hospitalar (Murray, 1990; Huycke *et al.*, 1998).

A espécie *E.faecalis* desperta especial interesse pelo facto de possuir vários plasmídeos, podendo alguns ser transferidos por conjugação a outras bactérias. Nos *E. faecalis* foram descobertos dois novos sistemas genéticos, os transposões conjugativos e plasmídeos que respondem a feromonas sexuais (Franke, *et al*, 1981; Murray, 2000). A existência de plasmídeos conjugativos não só em *E. faecalis* mas também em *E. faecium*, levou a que estas espécies fossem consideradas como reservatórios de plasmídeos para outros géneros de bactérias (*Enterococcus*).

Infeções humanas causadas por *Enterococcus* fora do ambiente hospitalar são muito raras e consistem em: (i) endocardite; (ii) infecções do trato urinário ou; (iii) infecções abdominais e/ou pélvica resultantes de contaminação pela microbiota fecal (Dunny *et al.*, 1978). Na atualidade, os *Enterococcus* surgem associados a infeções hospitalares (principalmente *E. faecalis*) e também associados ao uso de cefalosporinas de amplo espectro (a que os *Enterococcus* são resistentes). Os *Enterococcus* estão presentes muitas vezes no trato intestinal de pacientes hospitalizados. Fatores como a

presença de cateteres, imunossupressão, ou mucosite de quimioterapia alteram o equilíbrio da flora gastro intestinal e facilitam a infecção (Dunny *et al.*, 1978; Franke, *et al.*, 1981).

1.3. *Enterococcus* e sua resistência bacteriana

A resistência adquirida pelos *Enterococcus* às penicilinas foi descrita, primeiramente, em 1983 nos Estados Unidos da América, devendo-se à produção de β -lactamases mediadas por plasmídios transferíveis em amostras de *E. faecalis* (Dunny *et al.*, 1978). As β -lactamases dos *Enterococcus* são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico das penicilinas e demais β -lactâmicos inativando assim todos os representantes desta classe de antimicrobianos. Esse mecanismo de resistência é raro entre os *Enterococcus*, sendo mais comum em amostras da espécie *E. faecalis*, porém, também pode ocorrer em *E. faecium* (Hollenbeck *et al.*, 2013).

O principal mecanismo de resistência dos *Enterococcus* aos β -lactâmicos deve-se a alterações nas Penicillin Binding Proteins (PBPs). As PBPs dos *Enterococcus* resistentes aos β -lactâmicos apresentam afinidade diminuída a vários antimicrobianos dessa classe. Essa forma de resistência é observada principalmente em *E. faecium*, porém amostras de *E. faecalis* mostraram-se de igual forma resistentes aos β -lactâmicos, por igual mecanismo (Murray, 2000).

2. ANTIBIOTERAPIA

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos), que inibem o crescimento de bactérias, originando a sua destruição (antibióticos naturais). Podem ser produzidos unicamente através de processos de síntese química (antibióticos sintéticos) ou através de culturas de microrganismos que são posteriormente modificadas quimicamente (antibióticos semissintéticos). A finalidade da terapêutica com antibióticos é controlar e diminuir os agentes patogénicos, de modo a que o sistema imunológico seja capaz de os eliminar na totalidade (Sande *et al.*, 1993). Ao longo de décadas foram identificados centenas de antibióticos importantes para a aplicação em terapias de doenças infecciosas. Os antibióticos diferem nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espetro antibacteriano e nos mecanismos de ação. O conhecimento dos mecanismos moleculares de replicação das bactérias, facilitou o desenvolvimento de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais dos microrganismos (Chabner *et al.*, 2012).

2.1. Classificação dos antibióticos segundo a forma de ação nas bactérias

Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos e bactericidas dependendo se a ação é inibitória do crescimento bacteriano ou se resulta na destruição ou lise bacteriana, respetivamente (Calderwood e Moellering, 1990; Sande *et al.*, 1993). A classe de antibióticos bactericidas contempla o grupo dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, glicopéptidos e rifampicinas. Pode-se incluir nos antibióticos bacteriostáticos os macrólidos, as sulfamidas, tetraciclina entre outros (Brugueras e Garcia, 1998).

2.2. Classificação dos antibióticos segundo o mecanismo de ação

Outro método de classificação dos antibióticos é através do seu mecanismo de ação, ou seja, como atuam nas bactérias alvo de forma a neutralizá-las ou eliminá-las. Desta forma os antibióticos podem ser divididos em 5 grupos (Frisby, 1995; Sande *et al.*, 2013):

(i) Inibidores da síntese da parede celular bacteriana, atuando a nível da biossíntese do peptidoglicano (penicilinas);

(ii) Antibióticos que alteram a síntese das proteínas a nível ribossomal (Macrolidos, aminoglicosídeos);

(iii) Antibióticos que alteram o metabolismo dos ácidos nucleicos (Quinolonas);

(iv) Antibióticos antagonistas do metabolismo da síntese do ácido fólico (Sulfonamidas);

(v) Antibióticos que atuam diretamente na membrana celular bacteriana (Colistina).

2.3. Classificação dos antibióticos segundo a sua estrutura química

Segundo a estrutura química, os antibióticos podem ser classificados em:

(i) Derivados de mono-peptídios (e.g. cicloserina, azaserina);

(ii) Derivados do ácido 6-aminopenicilânico e análogos (e.g. penicilinas, cefalosporinas);

(iii) Derivados de 2-amino-1,3-propanodiol (e.g. cloranfenicol);

(iv) Derivados de hidrocarbonetos aromáticos (e.g. tetraciclina, rifamicinas);

(v) Derivados de macrolídicos (e.g. estreptomicina, neomicina, vancomicina);

(vi) Antibióticos poliênicos (e.g. anfotericina, nistatina);

(vii) Antibióticos polipeptídios (e.g. bacitracina, polimixina).

No entanto, este tipo de classificação é pouco usual na prática clínica, sendo adotada uma classificação em classes: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, anfenicóis, tetraciclina, polipeptídios, poliênicos, macrólidos, aminoglicosídeos, ansamicinas, antraciclina, lincomicina, nucleosídeos, glutarimidas, ionóforos (Webster, 2001).

3. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os antibióticos β -lactâmicos podem ser de origem natural ou semissintética. São caracterizados por possuírem um anel β -lactâmico na estrutura química. A sua atuação incide na inibição da última fase da síntese da parede celular das bactérias. Clinicamente é o grupo de antibiótico mais utilizado no combate a infecções bacterianas, possuindo um espectro bastante alargado. Atuam contra bactérias Gram positivo, Gram negativo e espiroquetas. Não são ativos contra o micoplasma visto ser desprovido de parede celular e também não atuam contra bactérias intracelulares. Podem classificar-se em quatro grupos diferentes: (i) penicilinas;(ii) cefalosporinas;(iii) monobactâmicos e; (iv) carbapenemos (Fontana *et al.*, 1994). Em termos de classificação é comum subdividir o grupo dos β -lactâmicos em famílias que incluem substâncias com grandes afinidades estruturais (Fontana *et al.*, 1992).

Os antibióticos alvo de estudo neste trabalho são a penicilina G e a ampicilina, ambos pertencentes à classe dos antibióticos β -lactâmicos.

3.1. História Antibióticos β -lactâmicos

O primeiro antibiótico β -lactâmico utilizado como agente terapêutico foi a penicilina. Devido ao aparecimento de resistências à penicilina, a partir de 1950 foram desenvolvidas as penicilinas semissintéticas com espectro de ação alargado, nomeadamente a meticilina, a ampicilina e a oxacilina. As cefalosporinas semisintéticas de 1ª geração (cefalotina, cefaloridina) resistentes às β -lactamases conhecidas na época, e eficazes contra bactérias Gram negativo, foram também introduzidas. A partir de 1970 surgiu a segunda geração de cefalosporinas nomeadamente a cefazolina e compostos pertencentes à terceira geração tais como a cefoxitina. Nesta década foram também introduzidas penicilinas de espectro alargado tais como a ticarcilina (Ligozzi *et al.*, 1991; Fontana *et al.*, 1992; Rice *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2005).

Na década de 80 surgiram as classes dos monobactâmicos (aztreonamo) e dos carbapenemos (imipenemo e meropenemo), em geral resistentes à ação das β -lactamases. Foram também aprovadas para uso terapêutico as cefalosporinas de espectro alargado incluídas na 3ª geração, nomeadamente a cefotaxima, ceftazidima, cefoperazona e ceftriaxona, e a penicilina de espectro alargado piperacilina (Bager *et al.*, 1997; Caiaffa Filho *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2004). Dentro do grupo dos antibióticos β -lactâmicos as penicilinas são das mais utilizadas e mais importantes. Possuem

propriedades químicas únicas sendo antibióticos de eleição na terapêutica de várias doenças infecciosas (Cetinkaya *et al.*, 2000).

3.2. Penicilinas

A descoberta da penicilina foi feita por Alexander Fleming em 1928, vindo mais tarde em 1940 a ser isolada e purificada por Chain, Morey e Abraham (Sousa, 2005). O mesmo autor refere que aquando do estudo laboratorial de *Staphylococos*, Alexander Fleming constatou que um tipo de bolor tinha contaminado uma das suas culturas, o que causou a lise de bactérias existentes na vizinhança. O bolor pertencia ao género *Penicillium*, pelo que Fleming deu o nome de penicilina à substância descoberta com propriedades antimicrobianas. Uma década depois, Chain, Morey e Abraham, desenvolveram a penicilina como agente terapêutico sistémico.

A penicilina é uma molécula caracterizada pela presença do anel β -lactâmico. Atualmente existem vários tipos de penicilinas com diferença estrutural na variação do radical R (Figura 1) (Noga *et al.*, 2003; Brown, 2004; Buynak, 2004). As penicilinas G e V são penicilinas naturais, isoladas dos fungos do género *Penicillium*, enquanto outras são semissintéticas sendo classificadas como: (i) amino-penicilinas (ampicilina e amoxicilina); (ii) carboxi-penicilinas (carbenicilina, ticarcilina, meticilina, cloxacilina, flucloxacilina e oxacilina) e; (iii) ureido-penicilinas (azlocilina, mezlocilina e piperacilina) (Perez-Trallero *et al.*, 2003; Bomono *et al.*, 2006; Zhanel *et al.*, 2007; Nomura *et al.*, 2010).

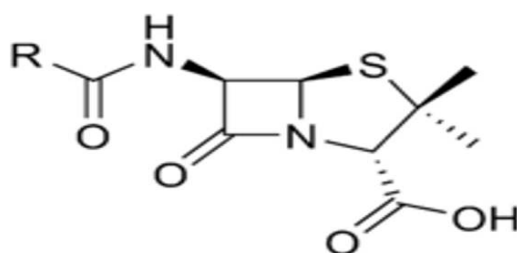


Figura 1. Estrutura química da penicilina que mostra o anel β -lactâmico. R= posição do substituinte; O = oxigénio; C = carbono; H = hidrogénio; N = azoto; S = enxofre (Sousa, 2005).

As penicilinas semissintéticas apresentam uma melhor atividade em consequência das modificações estruturais (Brown, 2004; Buynak, 2004). A ampicilina e a amoxicilina são penicilinas de amplo espectro que agem sobre bacilos Gram positivo

e Gram negativo, sendo estas sensíveis aos mecanismos de resistência das bactérias, como as β -lactamases que atuam sobre o anel β -lactâmico. A oxacilina é um antibacteriano de espectro reduzido, não tendo efeito sobre bacilos Gram negativos, mas sendo resistente à β -lactamase (Bomono *et al.*, 2006; Eggertson, 2007; Schindler, 2007; McDonald, 2010).

3.2.1. *Classificação das penicilinas*

De acordo com a origem e espectro de ação as penicilinas podem classificar-se em: (i) penicilinas naturais; (ii) aminopenicilinas; (iii) penicilinas antiestafilocócicas; (iv) carboxipenicilinas e; (v) ureidopenicilina. Tem diferentes vias de administração e espectros de ação que são descritos no quadro 1 (Seija e Vignoli, 2008).

Após a sua descoberta a penicilina foi o primeiro antibiótico a ser usado na prática clínica. Adicionando diferentes precursores ao meio de cultura de *Penicillium notatum* obtiveram-se misturas de penicilinas F, G, K, Y, X. A penicilina G foi obtida com maior eficácia a partir do isolamento em culturas de *Penicillium chrysogenum*, tendo sido adicionado ao meio, ácido fenilacético como precursor da fermentação (Brugueras e Garcia, 1998).

Quadro 1. Classificação das penicilinas de acordo com a origem e espectro de ação (Brugueras e Garcia, 1998).

Tipos de penicilina	Administração	Espectro de ação
Penicilinas Naturais		<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i>
Penicilina G	Intramuscular Intravenoso	Beta hemoliticus <i>Streptococcus viridans</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
Penicilina V	Via oral	<i>Clostridium spp</i> <i>Treponema pallidum</i> Actinomyces
Penicilinas Semissintéticas		
Amino Penicilinas		<i>Enterococcus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
Ampicilina	Intramuscular, intravenoso	<i>Haemophilus influenzae</i> não produtor de Beta lactamases
Amoxicilina	Via oral	<i>Salmonella spp</i> <i>E.coli</i> não produtora de beta lactamases
Penicilinas		
Antiestafilocócicas		
Cloxaciclina	Via oral	
Oxacilina	Via oral, intramuscular, intravenoso	<i>Staphylococcus spp</i> sensíveis à meticilina
Dicloxacilina	Via oral	
Carboxipenicilinas		
Ticarciclina	Intramuscular, intravenoso	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ureidopenicilinas	Intramuscular, intravenoso	

3.2.2. Mecanismo de ação da penicilina

A parede celular é uma estrutura vital para as bactérias tanto Gram positivo como Gram negativo, permitindo que estas possam viver em ambientes hipotônicos. Os antibióticos β -lactâmicos do grupo das penicilinas atuam inibindo a síntese de componentes da parede celular, causando a lise e por conseguinte a morte da bactéria (Sousa, 2001).

As penicilinas estão incluídas no grupo dos antibióticos anti-parietais (inibidores da síntese do peptidoglicano). O peptidoglicano é a substância que confere à membrana celular, a rigidez e a estabilidade a quase todas as bactérias, à exceção do *Mycoplasma*. Os Antibióticos anti-parietais, neste caso do grupo das penicilinas, atuam inibindo a síntese do peptidoglicano nas suas diferentes fases de biossíntese. Pertencem ao grupo dos antibióticos β -lactâmicos, sendo o anel β -lactâmico indispensável à sua ação antibacteriana (Sousa, 2001).

Na biossíntese do peptidoglicano vai existir a quebra de ligações covalentes, o que origina a inserção de novos “segmentos” recém-sintetizados. No processo de crescimento das células bacterianas, são necessárias enzimas autolíticas e enzimas com funções biossintéticas. As enzimas autolíticas e as enzimas com funções biossintéticas, glicosiltransferases, transpeptidases e carboxipeptidases encontram-se localizadas no folheto externo das membranas citoplasmáticas (MC). Estas são designadas por PBPs (Penicillin Binding Proteins) atuando como alvos dos antibióticos β -lactâmicos (Nikolaidis *et al.*, 2013). Existem 6 tipos de PBPs sendo as três primeiras PBPs (PBP 1, 2, 3) os alvos dos antibióticos β -lactâmicos: (i) inibição de PBP1- provoca a lise celular; (ii) inibição de PBP2- provoca a formação de esferoplastos; (iii) inibição de PBP3- provoca a formação de formas filamentosas (Kocaoglu *et al.*, 2013).

Os β -lactâmicos atuam inativando a atividade fisiológica das PBPs, causando a interrupção da síntese do peptidoglicano e exacerbando a atividade das autolisinas bacterianas, a consequência final deste processo é a morte e lise da célula bacteriana (Sousa, 2001). Os antibióticos β -lactâmicos têm de atravessar a parede celular bacteriana para atingir o alvo (PBPs), inativando-o. Só atuam em bactérias com parede celular, sendo mais eficientes em Gram positivo do que em Gram negativo, isto devido a diferenças estruturais na parede celular (Sousa, 2001).

3.2.3. *Penicilina G*

A penicilina G (Figura 2), também designada de benzilpenicilina, é instável em meio ácido ou alcalino, hidrolisando-se facilmente a pH 7. Pode apresentar-se sob a forma de pó seco com algum grau de higroscopia (sal sódico ou potássico), sendo por isso necessário o seu armazenamento em ambiente seco. A esterilização deste tipo de antibiótico deve ser efetuada por radiações ou gases tais como, o óxido de etileno, visto ser altamente sensível às temperaturas elevadas ocorrendo a sua inativação. O espetro de ação da penicilina G é basicamente direcionado contra Gram positivo, sendo a sua ação contra Gram negativo praticamente nula. Tem fraca absorção a nível do tubo digestivo devido ao baixo PH das secreções gástricas que destroem o antibiótico, havendo unicamente absorção de 1/3 da dose administrada via oral. Em doentes com idade superior a 65 anos ou em recém nascidos, em que o PH gástrico é mais elevado, há uma maior absorção. A absorção da penicilina G normalmente efetua-se a nível do duodeno atingindo um pico sérico ao fim de 30-60 minutos. Se a penicilina for administrada via parenteral e via intramuscular os picos máximos são atingidos em 15-30 minutos (Chabner et al., 2012).

A penicilina G é excretada pelos rins para a urina, havendo excreção e filtração glomerular, 90% da dose administrada é recuperada na forma biológica ativa na urina no intervalo de 1-2 horas. A administração da penicilina G tanto por via oral como intramuscular pode ter alguns efeitos secundários designadamente: quando usada em grandes doses pode ocasionar distúrbios gastrointestinais, problemas cardíacos, reações de hipersensibilidade em doentes atópicos, vertigens, cefaleias, alucinações e alergias. A penicilina G é indicada para o tratamento da Sífilis, faringite aguda e na profilaxia da endocardite por *Streptococcus spp.* Também é usada contra anaeróbios Gram positivo estritos (Sousa, 2005).

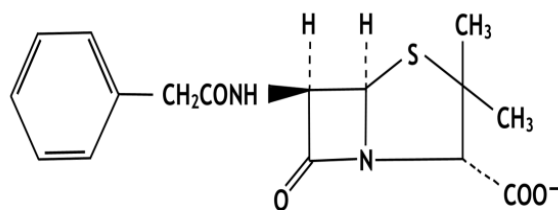


Figura 2. Estrutura química da penicilina G. O = oxigénio; C = carbono; H = hidrogénio; N = azoto (Sousa, 2005).

3.2.4. Ampicilina

A ampicilina foi descoberta em 1961 sendo a primeira aminopenicilina. As aminopenicilinas são penicilinas semissintéticas obtidas a partir do ácido 6-aminopenicilânico. Possuem melhor ação contra Gram negativo do que as penicilinas naturais, devido principalmente à existência de um grupo amina que se encontra inserido na posição alfa do anel β -lactâmico, o que aumenta a hidrofília da molécula do antibiótico ampliando assim a sua ação contra as bactérias Gram negativo. A sua carga elétrica também difere das penicilinas naturais sendo estas aniónicas e as aminopenicilinas anfotéricas. Esta característica melhora a penetração dos antibióticos a nível dos canais de porina existentes na parede celular das bactérias Gram negativo (Chabner et al., 2012).

A ampicilina é uma penicilina semissintética que possui um grupo amina (-NH₂) em posição alfa (Figura 3), encontrando-se inserido no núcleo benzénico do radical R, característica que diferencia a ampicilina da penicilina G. A presença de um grupo amina confere à ampicilina carga positiva dando-lhe um carácter anfotérico ou seja possui um polo positivo e um pólo negativo, no caso da penicilina G só existe carga negativa. A via de administração da ampicilina pode ser por via oral apresentando-se sob a forma carboxílica livre ou por via parentérica em que se apresenta sob a forma de sal sódico. É estável na presença de ácido gástrico, sendo bem absorvida pelo trato gastrointestinal (cerca de 40 a 50%). Após a sua administração é rapidamente difundida na maioria dos tecidos e fluídos do organismo alcançando níveis máximos de concentração sérica após 2 horas da administração via oral, caso a administração seja por via parentérica intramuscular as concentrações máximas séricas são atingidas muito mais rápido do que a mesma dose administrada por via oral. A excreção é realizada principalmente por via renal na forma não metabolizada, mas também através da bÍlis nas fezes. A eliminação

através dos rins é realizada por filtração glomerular, secreção tubular e reabsorção tubular. A disfunção renal diminui a excreção sendo a semivida da ampicilina no organismo superior nestes casos . Apresenta um amplo espectro antimicrobiano, tanto em Gram positivo como em Gram negativo (Sousa, 2005).

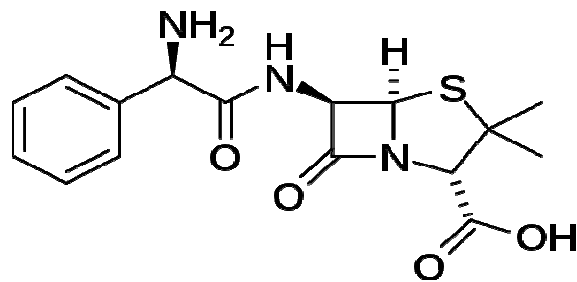


Figura 3. Estrutura química da ampicilina. O = oxigénio; S = enxofre; H = hidrogénio; N = azoto (Sousa, 2005).

4. AVALIAÇÃO DOS CRESCIMENTO BACTERIANO – CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

O uso indiscriminado e constante de antibióticos na medicina humana e veterinária tem determinado o aumento de resistência bacteriana, interferindo no tratamento efetivo das infecções por estes agentes (Bongers *et al.*, 1995).

A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (Nijsten *et al.*, 1993). O desenvolvimento de resistência bacteriana representa um potencial de risco à saúde pública (Bongers *et al.*, 1995; Baccaro *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana é avaliada através da determinação da quantidade mínima de antibiótico necessário para inibir o crescimento de um determinado microrganismo, esse valor é definido como Concentração Mínima Inibitória (CMI) (Pinto *et al.*, 2003; Fennel *et al.*, 2004). Existem diferentes métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de um determinado antibiótico entre os quais o método de microdiluição em que são efetuadas as microdiluições do antibiótico em estudo a fim de se determinar a CMI; o método de difusão por disco em que é colocado em contato, um disco impregnado do antibiótico em estudo, com um meio de cultura sólido e que posteriormente é avaliado o poder antimicrobiano analisando o halo de inibição do disco (Alves *et al.*, 2012).

De acordo com o Despacho nº14319/2005 de 29 de Junho, a quantificação das CMI permite a escolha da melhor terapêutica a administrar a cada doente, assim como adaptar a mesma a cada situação patológica. As CMI podem ser obtidas por vários métodos sendo o método de diluição o de referência proposta pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Consiste na preparação de meios líquidos ou sólidos aos quais são adicionadas concentrações crescentes de antibióticos, onde é semeada a mesma quantidade de inóculo e após incubação verifica-se a existência ou não de crescimento havendo determinação da CMI.

Os testes de diagnóstico têm um papel essencial para reduzir a propagação de bactérias multirresistentes, ajudando os clínicos a decidir se um antibiótico irá curar

uma infecção e a escolher qual o antibiótico mais apropriado. Estes testes são efetuados pelos laboratórios de microbiologia, que participam deste modo nos programas de vigilância e de controlo de antibioterapia através de testes de rastreio, de análises de diagnóstico rápidas, de testes de resistência (interpretação de resultados e seleção de antibióticos), da tipagem de estirpes e da vigilância epidemiológica (BioMérieux, 2010).

5. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da administração de dois antibióticos diferentes (natural versus semissintético) em bactérias Gram positivo do género *Enterococcus* espécies *faecium* e *faecalis*.

5.1. Objetivos específicos

Verificar se existem diferenças significativas entre o efeito do antibiótico natural (penicilina G) e o efeito do antibiótico semissintético (Ampicilina), de acordo com o género.

Verificar se existem diferenças significativas entre o efeito do antibiótico natural (penicilina G) e o efeito do antibiótico semissintético (Ampicilina) tendo em consideração as espécies *faecium* e *faecalis*, de acordo com o género.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudo

Estudo retrospectivo, descritivo e correlacional.

6.2. Amostra do estudo

A amostra da presente tese é designada de não probabilística e de conveniência, dado que a quantidade de utentes analisados pode não ser representativa da população infetada com as bactérias estudadas, visto que as amostras foram processadas por ordem de chegada ao setor de Microbiologia durante um período temporal. Fizeram parte da amostra total 314 utentes (162 do género masculino: $68,49 \pm 21,59$ anos de idade; 152 do género feminino: $61,15 \pm 23,04$ anos de idade) da Unidade Hospitalar de Bragança – ULSNE entre Outubro de 2009 e Dezembro de 2012 . Da amostra total, 70% dos utentes encontravam-se hospitalizados em diversos serviços da Unidade Hospitalar e 30% eram utentes externos (i.e. a realizarem exames laboratoriais de rotina). Visto que o produto biológico analisado em maior percentagem foi a urina, o género foi alvo de estudo visto que indivíduos do sexo feminino são mais propensos a contrair infeções urinárias do que indivíduos do sexo masculino, devido á anatomia da uretra feminina ser mais curta que a uretra masculina, encontrando-se em maior proximidade com o ânus e vagina onde as bactérias estão presentes.

6.3. Procedimentos

6.3.1. Isolamento e identificação das bactérias

Os produtos biológicos deram entrada no Serviço de Patologia Clínica, especificamente no setor de Microbiologia da Unidade Hospitalar de Bragança da ULSNE, entre Outubro de 2009 e Dezembro de 2012. Os produtos biológicos processados foram a urina, expetoração, cateter, pús, hemoculturas e outros líquidos biológicos que incluem o líquido ascítico, líquido pleural e o líquido cefalorraquidiano. Os mesmos (i.e produtos biológicos) foram processados de acordo com a metodologia implementada no Serviço (quadro 2). Foram utilizados meios de cultura sólidos: Gelose de Sangue (GS), Gelose de chocolate (GC), Manitol, MacConkey, Saboround, Cystine Lactose Electrolyte Deficien (CLED), Uricult®Plus (combinação de uma placa com três meios: Cled, MacConkey, meio de *Enterococcus*) e um meio de cultura líquido: Brain Heart (BH).

Quadro 2. Procedimento para o tratamento de produtos biológicos.

Produto biológico	Meios de cultura	Método de sementeira	Exame direto	Tempo/Temperatura de incubação
Urina	CLED, Uricult®Plus	Estria Central, Imersão	Gram, exame microscópico a fresco do sedimento	18-24 horas/37°C
Expetoração	GS, GC Manitol, MacConkey, Saboround.	Quatro quadrantes (Esgotamento)	Gram	18-24 horas/37°C
Líquido Biológico (i.e. Líquido Pleural, LC.R, Líquido Ascítico)	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Catéter	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Pús	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Hemocultura	GS, GC, Manitol, MacConkey	Quatro quadrantes (Esgotamento)	Gram	18-24 horas/37°C

A figura 4 ilustra o método de sementeira de urina por estria central, inoculando-se aproximadamente 10 µl de amostra com o auxílio de uma ansa calibrada em meio de CLED.

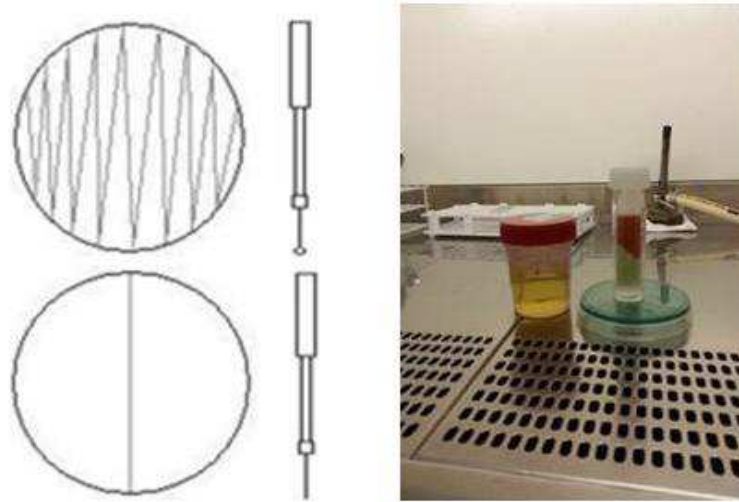


Figura 4. Meio de cultura CLED e amostra de urina.

A figura 5 ilustra o método de sementeira em 4 quadrantes e por inoculação em meio líquido de enriquecimento, estes métodos de sementeira são utilizados em sementeiras de produtos biológicos tais como pontas de cateter, pús e líquidos biológicos.



Figura 5. Meios de cultura GS, GC, BH, Manitol, Mackonkey, e amostras de pús, líquido biológico e ponta de catéter.

A figura 6 ilustra o método de sementeira em 4 quadrantes, estes métodos de sementeira são utilizados em sementeiras de produtos biológicos tais como hemoculturas e expetoração.

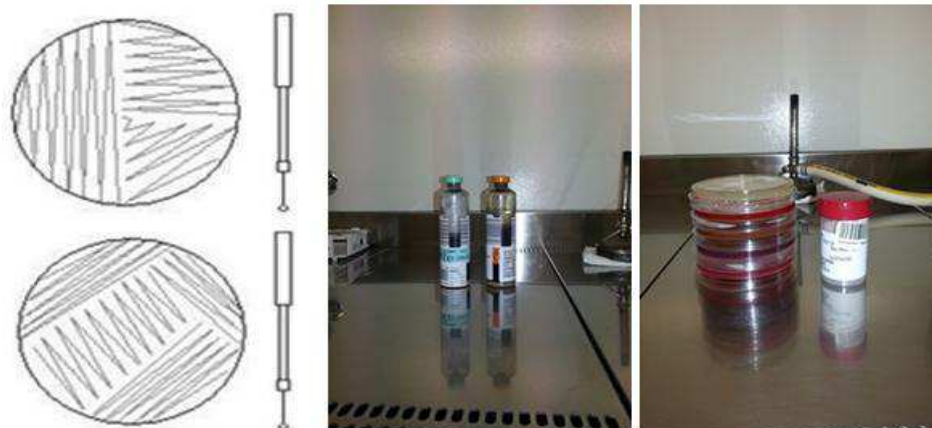


Figura 6. Meios de cultura GS, GC, Manitol, Mackonkey, Saboround e amostras de hemocultura e expetoração.

Após incubação a 37°C durante 24 horas, nos meios em que se verificou crescimento bacteriano considerável, realizou-se uma coloração de Gram das colónias alvo. Esta coloração teve como objetivo determinar a reação das bactérias aos corantes e por conseguinte diferenciar os Gram positivo e Gram negativo. Foi simultaneamente avaliada a morfologia bacteriana para distinção entre cocos, diplococos ou bacilos. Para diferenciação entre espécies de Gram positivo foi efetuada a prova da catalase a fim de distinguir o género *Enterococcus* do género *Staphylococcus*. As espécies identificadas como Gram positivo do género *Enterococcus* foram testadas quanto à sua sensibilidade e resistência bacteriana. A identificação definitiva é efetuada utilizando uma carta de identificação de Gram Positivo (GP) em que é obtido o género e a espécie da bactéria. A determinação da CMI é efetuada utilizando uma carta de antibiograma AST-586, que determina as suscetibilidades bacterianas aos antibióticos. A identificação definitiva e a determinação da CMI são efetuadas pelo sistema automatizado VITEK-2 (Bio-Merieux, Lyon, France) existente no setor de microbiologia da Unidade Hospitalar de Bragança da ULSNE.

6.3.2. Testes de sensibilidade

Foram efetuados testes de sensibilidade às bactérias anteriormente isoladas e identificadas (*E. faecalis* e *E. faecium*) tendo sido posteriormente determinado a CMI de cada um dos antibióticos testados (penicilina G e ampicilina). A determinação da CMI é efetuada usando concentrações de antibióticos derivadas de duplas diluições sucessivas (BioMérieux, 2010). A CMI é então determinada a partir da adição da concentração mais baixa de antibiótico em que ocorre inibição do crescimento bacteriano, sendo utilizado o método de diluição em caldo “Broth Dilution” ilustrado na figura 7. Foi utilizada uma carta de antibiograma específica para a determinação *in vitro* da sensibilidade do género *Enterococcus* a agentes antimicrobianos, baseada na técnica de CMI descrita por Maclowry e Marsh (1968) e Gerlach (1974). Cada carta possui 64 micropoços contendo meios de cultura Cation-adjusted Muller-Hinton broth (CAMHB), Muller-Hinton Agar (MHA) misturados com concentrações conhecidas do antibiótico a testar (quadro 3) e um micropoço que contém unicamente meio de cultura sendo este o micropoço de controlo (Wikler *et al.*, 2007).

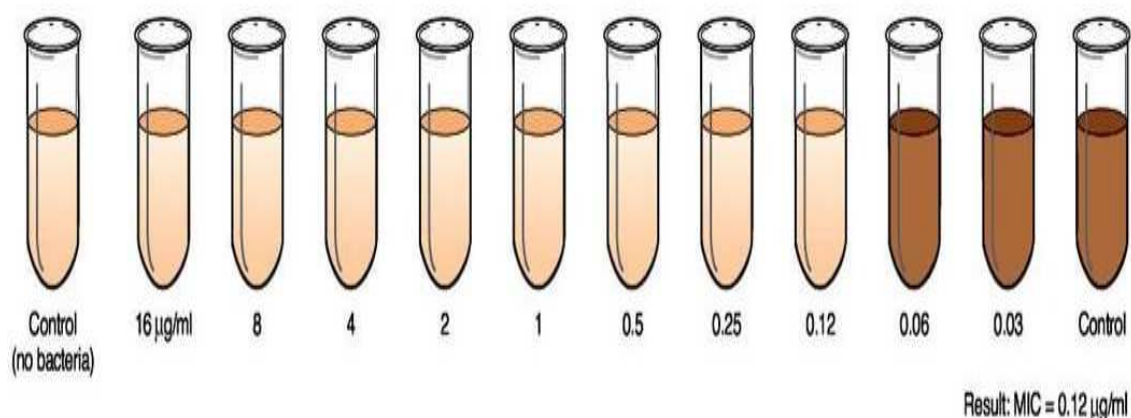


Figura 7. Determinação da CMI pelo método de Broth Dilution (BioMérieux, 2010).

O preenchimento da carta efetuou-se com uma suspensão de bactérias obtidas por inoculação de colónias alvo, em 3 ml de solução salina entre 0,5 e 0,63 padrão de MacFarland (Wikler *et al.*, 2007). Posteriormente realizou-se uma diluição transferindo 280 µl da suspensão inicial para uma solução salina de 0,45% de 3 ml. A suspensão final é inoculada na carta de antibiograma e incubada entre 35°C e 37°C, em condições de aerobiose durante 18 a 24 horas. Após a incubação o sistema automático avalia cada padrão de crescimento dos microrganismos na presença de antibióticos, em relação ao crescimento no poço de controlo, sendo determinado o valor da CMI para os

antibióticos testados. Os resultados são expressos qualitativamente como sensível ou resistente podendo ser expresso quantitativamente em $\mu\text{g/ml}$, estes valores encontram-se descritos no quadro 3.

Quadro 3. Antibióticos em estudo da CMI (Wikler *et al.*, 2007).

Antibiótico	Concentração adicionada em $\mu\text{g/ml}$	Intervalo de Concentração	Sensível ($\mu\text{g/ml}$)	Resistente ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	0,5; 4; 8; 32	0,5-32	≤ 8	≥ 16
Penicilina G	0,125; 0,25; 1; 2; 8; 64	0,12-64	≤ 8	≥ 16

A interpretação da CMI obtida nas cartas de antibiograma utilizadas está de acordo com as interpretações definidas pela Food And Drug Administration (FDA), Clinical na Laboratory Standards Institute (CLSI®) ou Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) e do European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (BioMérieux, 2010).

6.4. Procedimentos estatísticos

A análise dos dados foi composta pela análise: (i) exploratória; (ii) descritiva e; (iii) inferencial dos dados.

Em relação à análise exploratória foram realizados gráficos (histogramas, *high-low*, *box-and-whisker plots*) de forma a maximizar a percepção ou visualização do conjunto de dados, descortinando estruturas subjacentes e detetando valores atípicos (*outliers*), bem como a deteção e possível extração de variáveis importantes para o desenvolvimento de modelos parcimoniosos.

Foi realizada a análise de simetria (*skewness*) e de achatamento (*kurtosis*) das curvas e aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para averiguar se os valores registados apresentam uma distribuição normal.

Na análise descritiva foi calculada a percentagem de distribuição dos produtos orgânicos utilizados e da resposta dos antibióticos: (i) por bactéria e; (ii) por género.

Na análise inferencial foi utilizada a ANOVA dois fatores para analisar a variância de cada um dos antibióticos (i.e. ampicilina e penicilina), de acordo com a bactéria e o género. O Teste-t *student* emparelhado foi utilizado para analisar as diferenças entre a ampicilina e penicilina por bactéria e por género. O nível de significância foi colocado em $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

As figuras 4, 5 e 6 apresentam a caracterização descritiva (%) dos produtos orgânicos utilizados para a amostra total, género masculino e feminino, respetivamente. Verificou-se que para a amostra total (Figura 4), assim como para cada género (masculino: Figura 5; feminino: Figura 6). A urina foi o produto orgânico com maior percentagem de recolha (total: 62%; masculino: 59%; feminino: 64%), seguida do pús (total: 21%; masculino: 20%; feminino: 22%).

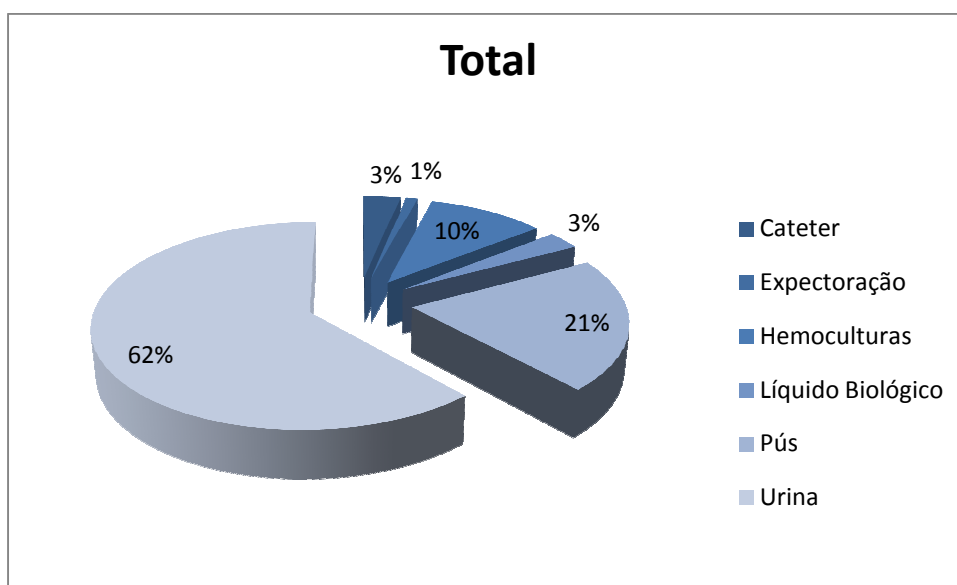


Figura 8. Caracterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para a amostra total (%).

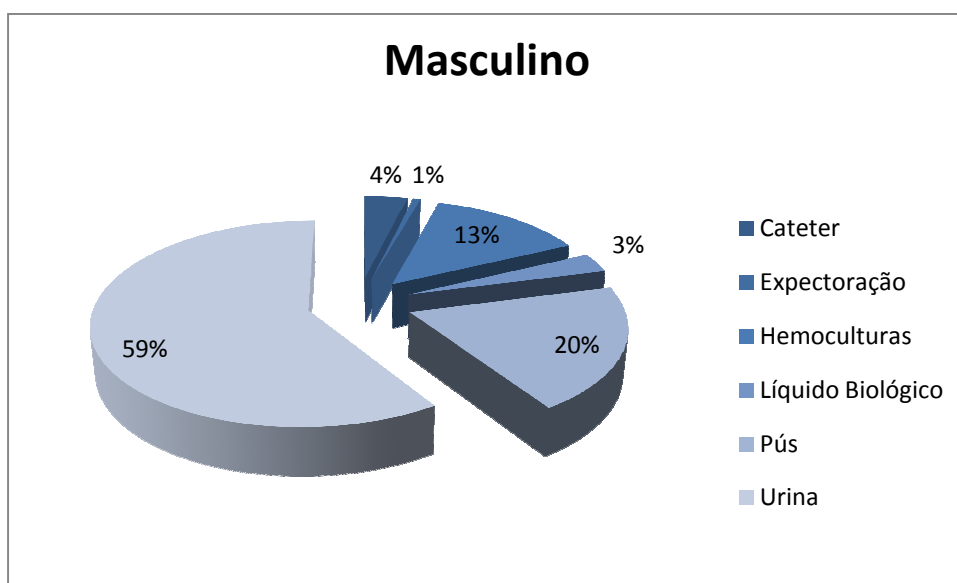


Figura 9. Caracterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para o género masculino (%).

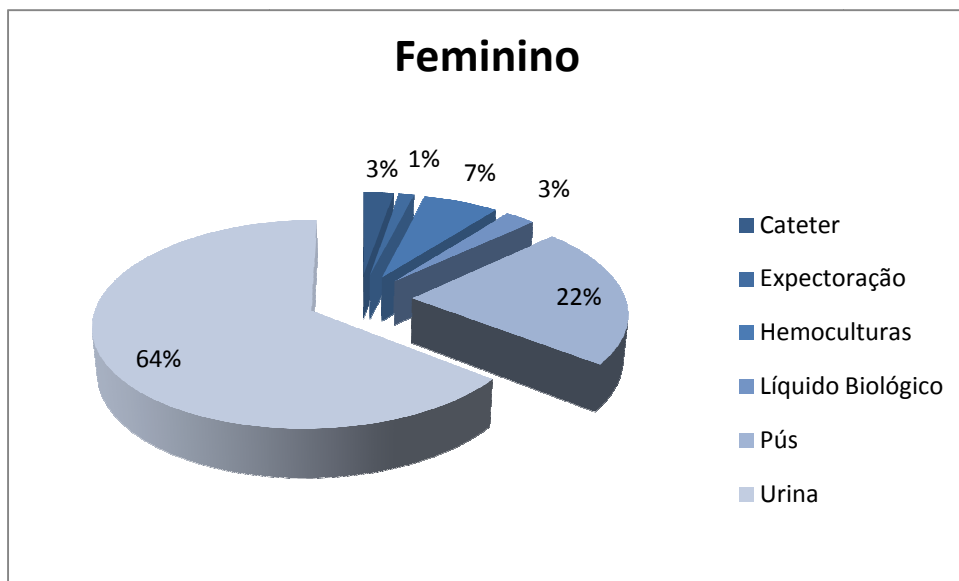


Figura 10. Caraterização descritiva dos produtos orgânicos utilizados para o género feminino (%).

As figuras 7, 8 e 9 apresentam a quantidade (%) de utentes infetados com a bactéria *E.Faecalis* e *E.Faecium* para a amostra total, para o género masculino e feminino, respetivamente. Para a amostra total verificou-se que a maioria dos utentes (82%) estava infetada com a bactéria *E.faecalis* e a restante (18%) com a bactéria *E.faecium*. Para o género masculino e feminino verificou-se a mesma tendência. Para o género masculino (*faecalis*: 78%; *faecium*: 22%) e para o género feminino (*faecalis*: 86%; *faecium*: 14%).

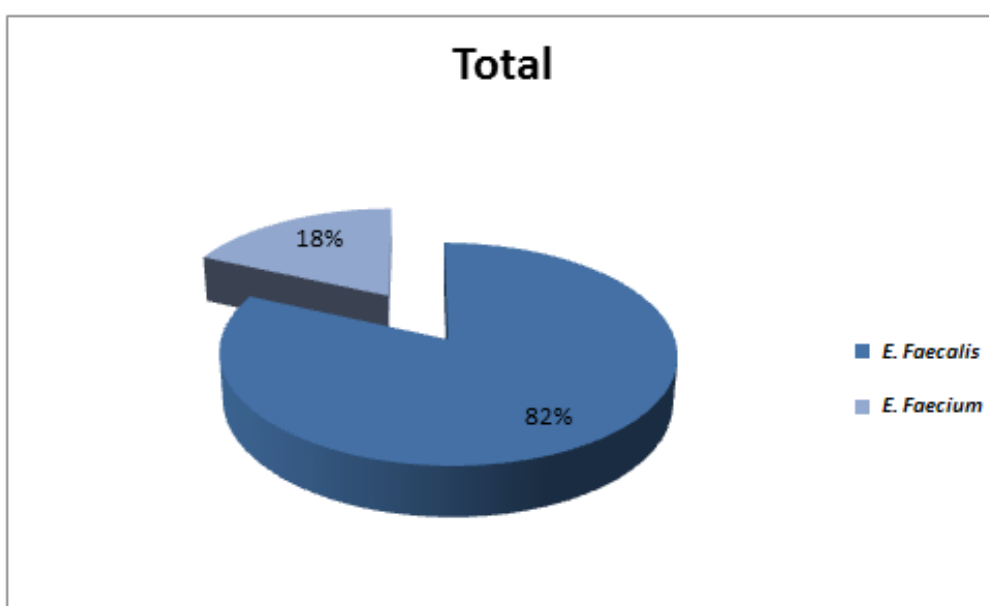


Figura 11. Percentagem (%) de utentes infetados por bactéria para a amostra total.

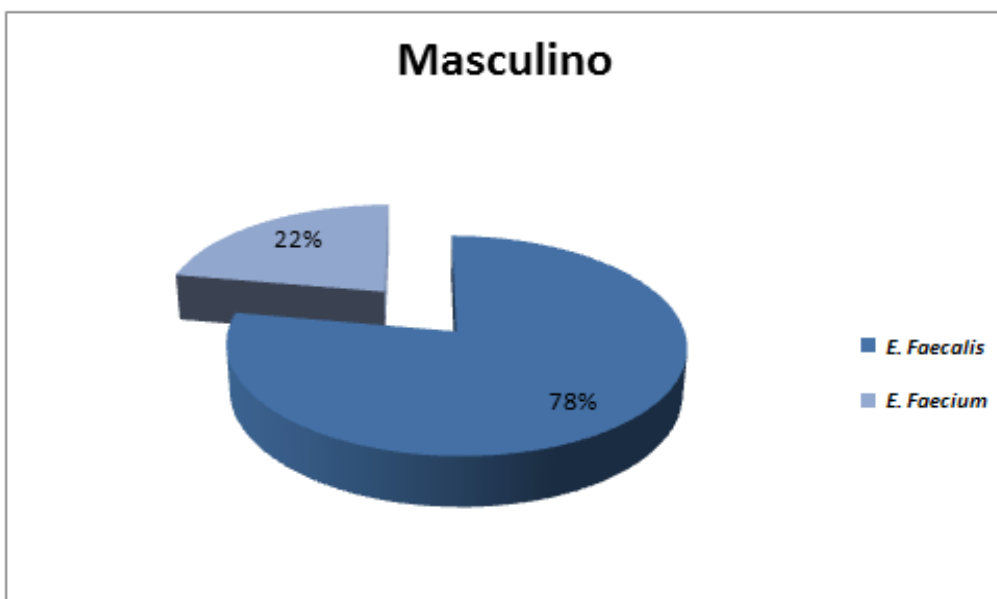


Figura 12. Percentagem (%) de utentes infetados por bactéria para o género masculino.

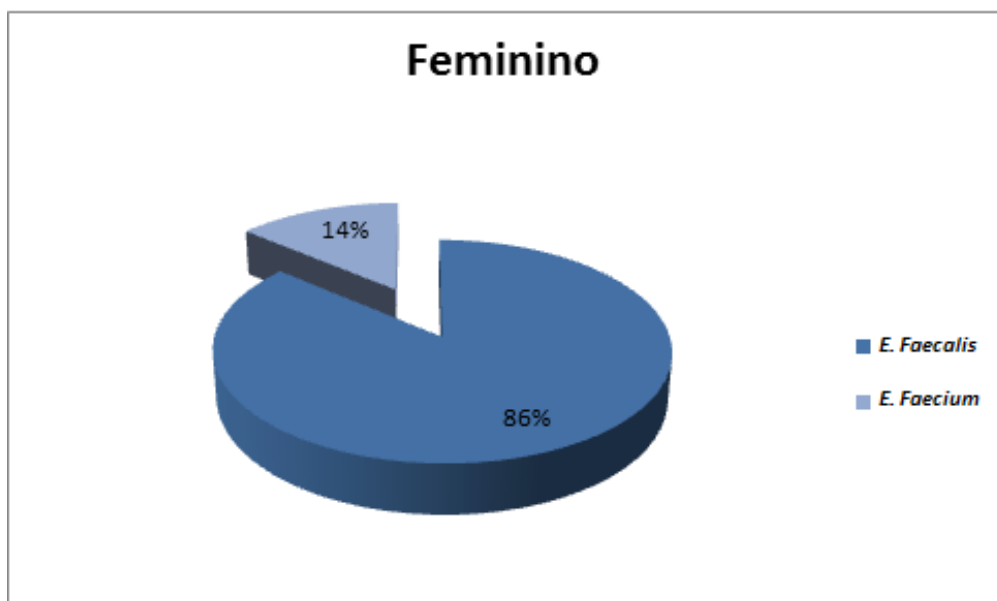


Figura 13. Percentagem (%) de utentes infetados por bactéria para o género feminino.

As figuras 10, 11 e 12 apresentam a percentagem da sensibilidade e da resistência de cada uma das bactérias existentes (i.e. *E. faecium* e *E. faecalis*) à administração da ampicilina e da penicilina para a amostra total, género masculino e feminino, respetivamente. Para a amostra total (Figura 10), verificou-se que a bactéria *E. faecium* foi maioritariamente resistente tanto para a ampicilina (89,5%) como para a penicilina (91,2%). Já a bactéria *E. faecalis* foi maioritariamente sensível, para ambos

os antibióticos (i.e. ampicilina e penicilina). A análise quando separada por género seguiu a mesma tendência. Em ambos os géneros (masculino: Figura 11; feminino: Figura 12) a bactéria *E. faecium* foi maioritariamente resistente tanto à ampicilina (masculino: 88,9%; feminino: 90,5%) como à penicilina (masculino: 91,7%; feminino: 90,5%). E a bactéria *E. faecalis* foi maioritariamente sensível para ambos os antibióticos com as mesmas percentagens de sensibilidade em cada género (masculino: 65,1%; feminino: 67,9%).

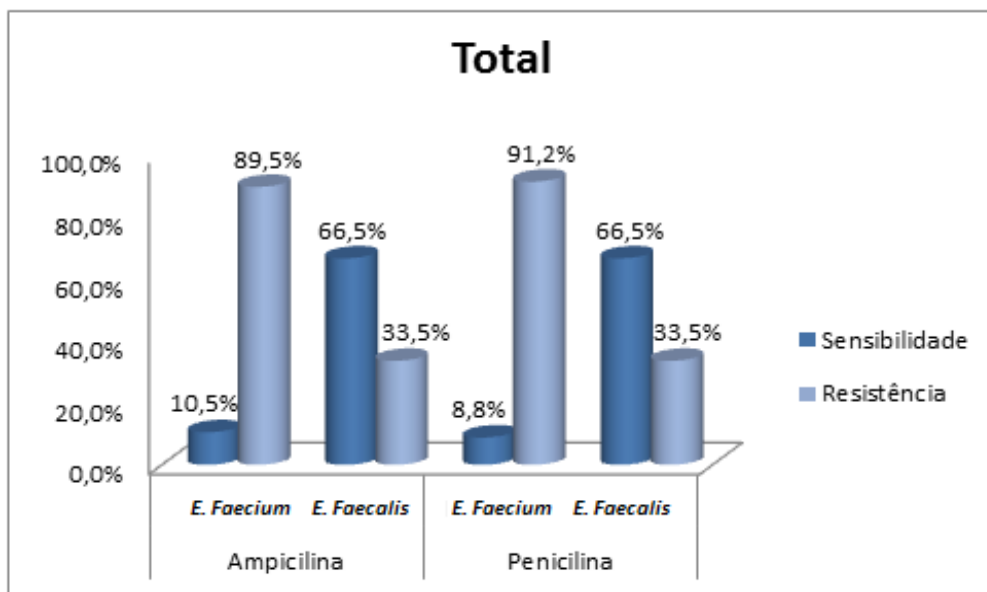


Figura 14. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. faecalis* ($p < 0,001$), em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para a amostra total (género: $p > 0,05$).

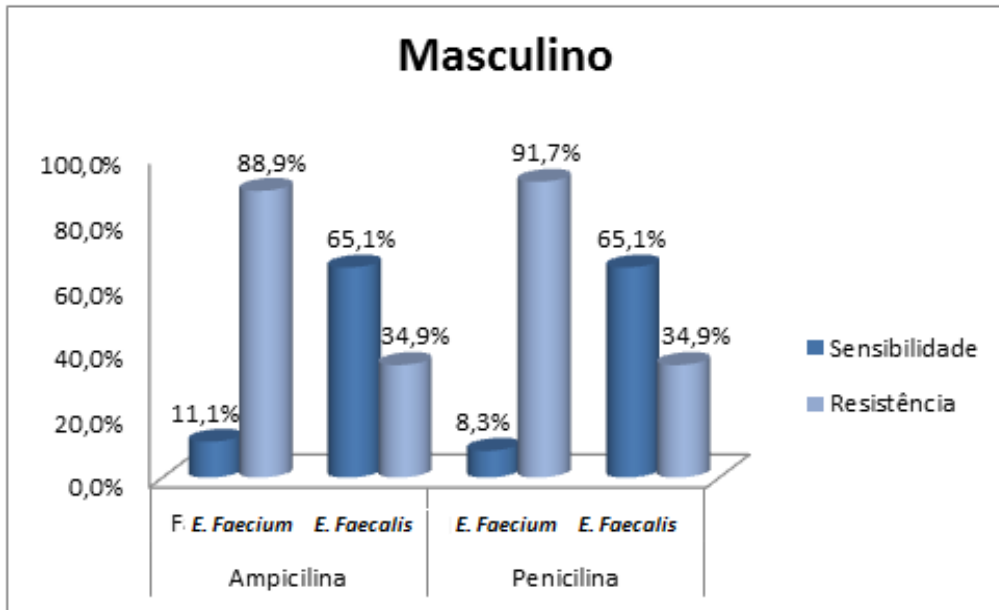


Figura 15. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. faecalis* ($p < 0,001$), em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para o género masculino.

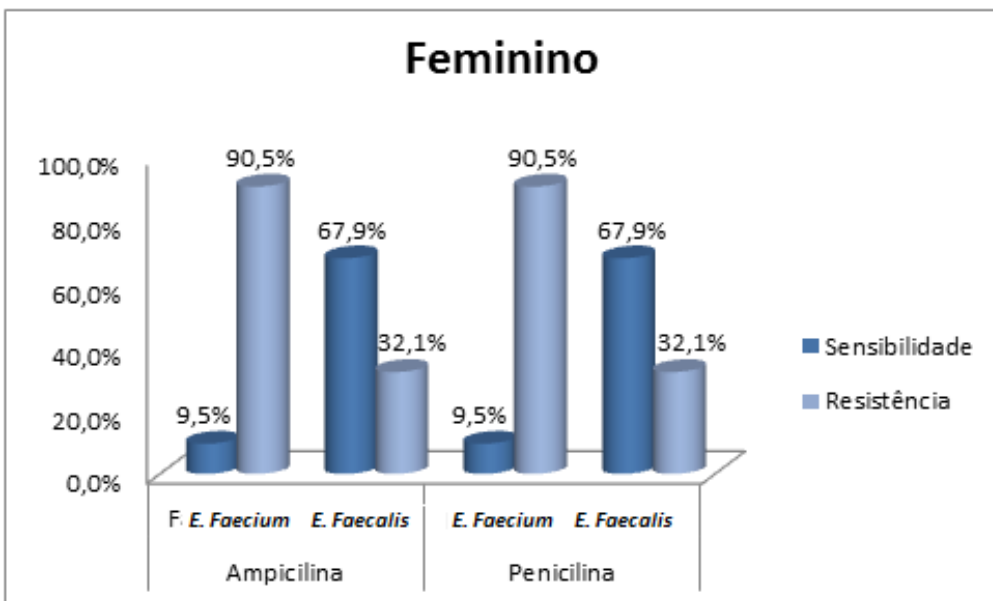


Figura 16. Percentagem da sensibilidade e da resistência das bactérias *E. faecium* e *E. faecalis* ($p < 0,001$), em relação à administração da ampicilina e da penicilina, respetivamente, para o género feminino.

Em ambos os antibióticos verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de resposta possíveis (i.e. sensível ou resistente). Para a ampicilina ($F_{1,313} = 330,71$; $p < 0,001$) e para a penicilina ($F_{1,313} = 342,62$; $p < 0,001$). O

quadro 4 apresenta a análise de variância em relação à resposta da ampicilina e penicilina. A bactéria teve um efeito estatisticamente significativo na administração da ampicilina ($F_{1,313} = 68,82$; $p < 0,001$). No entanto, o género não teve efeito significativo ($F_{1,313} = 0,009$; $p < 0,92$), assim como a interação bactéria X género ($F_{1,313} = 0,11$; $p < 0,74$), na ampicilina. A tendência foi semelhante para a administração da penicilina. A bactéria teve um efeito estatisticamente significativo na administração da penicilina ($F_{1,313} = 73,21$; $p < 0,001$), o género ($F_{1,313} = 0,09$; $p < 0,76$) e a interação bactéria X género ($F_{1,313} = 0,01$; $p < 0,90$) não registaram significância.

Quadro 4. Anova 2 fatores para ampicilina e penicilina.

	Efeito Bactéria		Efeito Género		Interação Bactéria X Género	
	F	p	F	P	F	p
Ampicilina	68,82	<0,001	0,009	0,92	0,11	0,74
Penicilina	73,21	<0,001	0,09	0,76	0,01	0,90

F – valor do teste de F; p – valor de significância.

As figuras 13, 14 e 15 apresentam as comparações emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria e género, para a amostra total (Figura 13), género masculino (Figura 14) e feminino (Figura 15), respetivamente. Para a bactéria *E. faecalis*, não se verificou qualquer diferença entre os dois antibióticos para a amostra total, masculino e feminino já que o erro padrão foi zero para estes três casos. Em relação à bactéria *E. faecium* também não se verificaram diferenças significativas na administração dos dois antibióticos sendo que para a amostra total, ($p = 0,32$), masculino ($p = 0,32$) e feminino, o erro padrão foi zero.

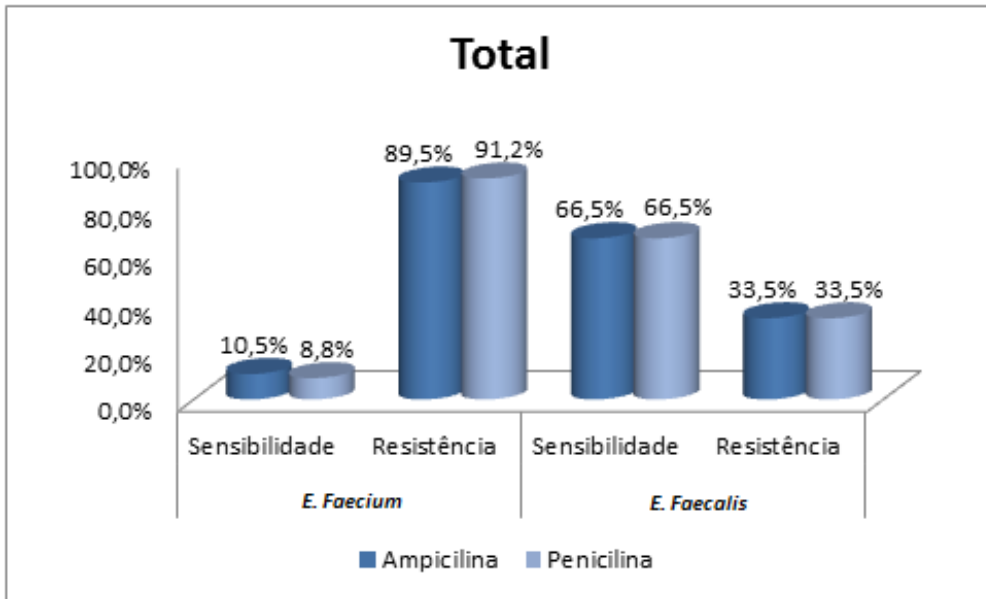


Figura 17. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($p > 0,05$) para a amostra total (género: $p > 0,05$).

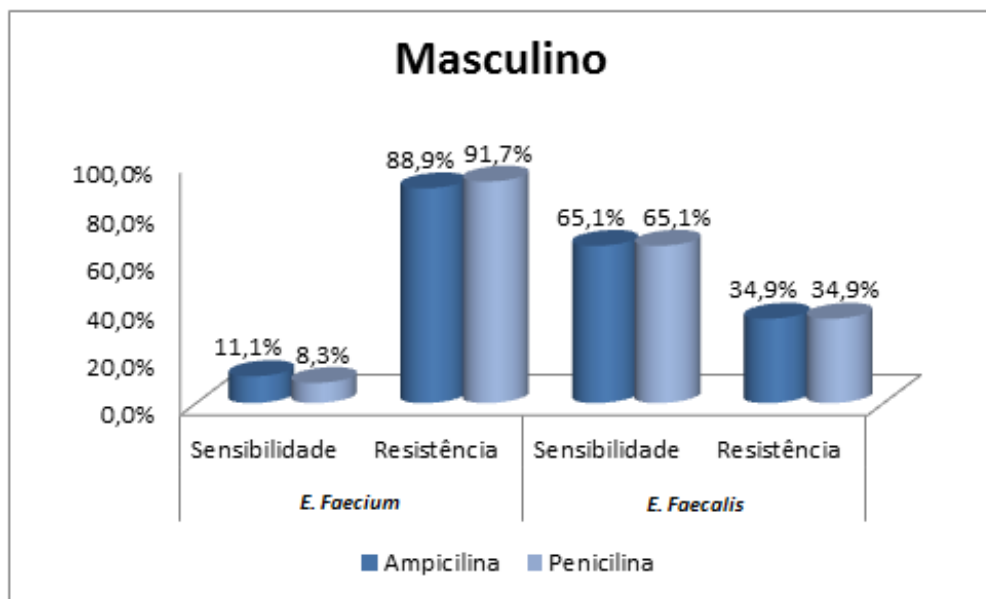


Figura 18. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($p > 0,05$) para o género masculino.

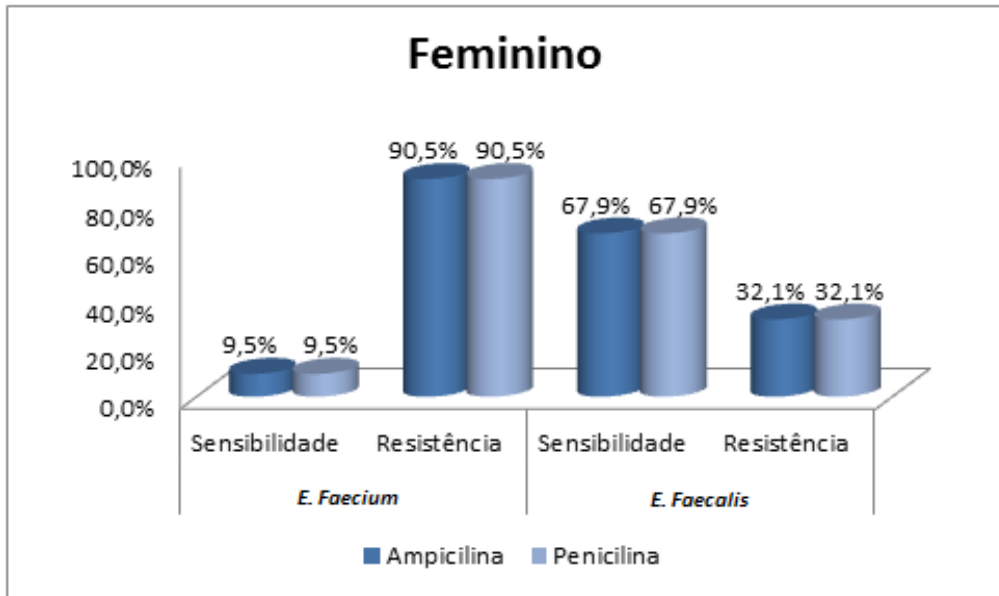


Figura 19. Comparação das amostras emparelhadas entre a ampicilina e penicilina, por bactéria ($p > 0,05$) para o género feminino.

8. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O objetivo da presente tese foi comparar a atuação entre dois antibióticos da família da penicilina, sendo um deles natural (penicilina G) e outro semi-sintético (ampicilina), em bactérias Gram positivo do género *Enterococcus* das espécies *faecium* e *faecalis*. Como principais resultados, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a atuação (i.e. sensibilidade e resistência) da penicilina G e da ampicilina nos *Enterococcus faecium* e *faecalis*. Verificou-se um efeito significativo da bactéria em que o *E. faecium* foi mais resistente tanto à ampicilina como à penicilina. Por sua vez, o género não registou efeito significativo, o que significa que o efeito de ambos os antibióticos não varia de acordo com o género (i.e. masculino versus feminino).

A colheita e processamento dos produtos biológicos estudados foram obtidos a partir de técnicas assépticas, técnicas usadas como objetivo de minimizar a contaminação da amostra de forma a não alterar os resultados finais. Constatou-se que as amostras biológicas urina e pús foram os produtos estudados em maior percentagem. Todos os produtos analisados deram entrada no setor de Microbiologia sem critérios de seleção, dado que foram clínicos da especialidade a pedirem a análise do produto. Esta é uma prática comum das unidades hospitalares, ou seja, a realização de exames microbiológicos a diferentes produtos biológicos de modo a identificar qual o foco da infeção. O tratamento dos produtos biológicos foi efetuado de acordo com as normas standardizadas para a prática clínica. A identificação da bactéria foi feita numa primeira fase através de procedimentos manuais (avaliação visual da morfologia bacteriana, prova da catálase e observação do Gram) sendo posteriormente efetuada a identificação confirmatória quanto ao género e espécie da bactéria em estudo. O rácio de infeções causadas por *E. faecalis* em relação a infeções causadas por outras espécies de *Enterococcus* é aproximadamente de 10 para 1. Apesar do aumento da percentagem de infeções causadas por *E. faecium*, a literatura relata diferenças entre as infeções, sendo que a infeção pelo *E. faecalis* continua a ser a mais prevalente (Comerlato *et al.*, 2013). Os autores, Sreeja *et al.* (2012) e Doddamani *et al.* (2013) realizaram estudos em amostras biológicas provenientes de unidades hospitalares identificando bactérias do género *Enterococcus*. Em ambos os estudos verificou-se que a percentagem de *E. faecalis* é superior à percentagem de *E. faecium*. Desta forma, e tal como o estado da arte tem vindo a constatar, também a população de *E. faecalis* (82%) em estudo na

presente tese de mestrado foi manifestamente superior à população de *E. faecium* (18%) para a amostra total.

A obtenção da CMI pode ser obtida a partir de vários métodos: (i) E Test, (ii) Agar Dilution, (iii) Broth Dilution e (iv) Disk Diffusion (Baker *et al.*, 1991). Os autores referidos efetuaram um estudo de comparação entre os quatro métodos de obtenção da CMI, concluindo que produzem resultados similares entre eles (Baker *et al.*, 1991). Assim, a literatura descreve estes 4 métodos mencionados como indicados para obtenção da CMI. No entanto, o método de Broth Dilution é descrito como um método facilmente adaptável a sistemas automatizados. É um dos métodos mais utilizados em laboratórios de microbiologia nos Estados Unidos, sendo que uma das vantagens na utilização deste método é que se pode efetuar a identificação e os testes de sensibilidade antimicrobiana e simultaneamente reduz o tempo de resposta na atuação contra a infecção (Jorgensen, 1993). A obtenção de CMI em bactérias do Género *Enterococcus* a partir do método de Broth Dilution foi estudada por Hashimoto *et al.*, (2012) que compararam as CMI obtidas a partir do método de Broth Dilution e do método de Agar Dilution em bactérias do Género *Enterococcus*. As CMI obtidas com o método de Broth Dilution estão concordantes com as CMI obtidas com o método de Agar dilution em 73% dos casos estudados. Os autores concluíram que o método de Broth Dilution é adequado para a determinação da CMI em *Enterococcus*. Os resultados da CMI da presente tese de mestrado foram obtidos pelo método de Broth Dilution numa carta de antibiograma direcionada para a obtenção das CMI em Gram positivos do género *Enterococcus*. A carta de antibiograma utilizada (AST-P586) possui vários micropoços impregnados de diferentes tipos de antibióticos que vão ser inoculados e testados contra as bactérias em estudo no sistema automatizado (Vitek[®]2, Lyon, France).

Durante décadas foi estudada e reconhecida a resistência de *Enterococcus* a vários antibióticos tais como vancomicina, aminoglicosídeos e antibióticos β -lactâmicos, tornando-se assim um género de bactérias multirresistentes e um importante agente nosocomial (Murray 1990; Grayson *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 1991). Os *Enterococcus* possuem um grande potencial para produzir genes resistentes a novas formas de antibioterapia, causando assim sérias dificuldades na forma como é dirigida a terapêutica. Espécies produtoras de β -lactamase que são resistentes à penicilina são sensíveis à gentamicina, à ampicilina-sulbactam, à ampicilina- ácido clavulânico ou à

vancomicina. As espécies que são resistentes a antibióticos β -latâmicos não produtoras de β -lactamases e respondem bem à terapêutica com vancomicina e gentamicina (Marothi, 2005). A penicilina G e a ampicilina foram recomendadas como antibióticos de referência no tratamento de infecções por *Enterococcus*, embora a ampicilina tenha uma CMI mais baixa, a penicilina G foi a preferida no tratamento devido ao seu baixo custo e menores efeitos secundários no paciente (Herman *et al.*, 1991). Hoje em dia existem diversos antibióticos eficazes na atuação contra os *Enterococos*, quer em associação quer em formas simples. Apesar deste género de bactérias se tornarem cada vez mais resistentes, a escolha do antibiótico não deve depender só da CMI determinada, devendo-se ter em conta o tipo de infeção que está a ser tratada, a sua gravidade e a resposta aos antibióticos administrados (Marothi, 2005).

A literatura parece não ser concordante no que diz respeito à resistência da penicilina, nomeadamente, para as bactérias *E.faecium* e *E.faecalis* em amostras semelhantes. No estudo realizado por Sreeja *et al.*, (2012) os autores verificaram que numa população de 128 *Enterococcus* houve resistência à penicilina na ordem de 47%. A taxa de resistência dos *E.faecalis* (48,6%) foi superior à taxa de resistência dos *E. faecium* (41,6%). Por sua vez, Garcia-Vázquez *et al.*, (2013) realizaram um estudo em doentes com bacteriémias por *Enterococcus* onde foi analisada a suscetibilidade antibacteriana a vários antibióticos entre os quais a penicilina. Verificou-se que a taxa de resistência à penicilina do *E. faecium* (76,9%) foi superior à taxa de resistência do *E.faecalis* (2,2%). Estes dois estudos citados apresentam algumas diferenças relativamente aos produtos biológicos utilizados e também na metodologia do estudo da sensibilidade antimicrobiana. Garcia-Vázquez *et al.*, (2013) utilizaram como produtos biológicos unicamente hemoculturas que foram testadas quanto à sensibilidade antimicrobiana através da metodologia de Broth Dilution. Já no estudo de Sreeja *et al.*, (2012) foram utilizados produtos biológicos diferentes entre os quais urina, pús, hemoculturas e líquidos biológicos em que foram testados a partir da metodologia de Disk Diffusion. Desta forma, pode especular-se se este fator (i.e. utilização de metodologias de teste de sensibilidade antimicrobiana distintas) pode ser o indicador responsável para os resultados diferentes que foram obtidos nestes dois estudos com amostras semelhantes. No presente estudo, tal como indicado na Figura 10, os resultados indicam que o *E. faecalis* apresentou uma taxa de resistência de 33,5% e o *E. faecium* uma taxa de resistência de 91,2% à penicilina G para a amostra total. Apesar de

terem sido utilizados produtos biológicos diferentes na sua globalidade estes resultados são semelhantes aos apresentados no estudo de Garcia-Vázquez *et al.*, (2013), em que foi utilizada uma metodologia de teste de sensibilidade antimicrobiana semelhante (i.e. Broth Dilution). Já em relação à sensibilidade o *E. faecalis* apresentou uma taxa de 66,5% e o *E. faecium* de 8,8%. Para o género masculino e feminino os resultados para a resistência e para a sensibilidade foram semelhantes, com maior taxa de resistência para o *E. faecium* e maior taxa de sensibilidade para o *E. faecalis*.

A ampicilina é uma das terapias de escolha para o tratamento de infeções por *Enterococcus*, podendo existir resistências antibacterianas por parte de alguma espécies de *Enterococcus*. A resistência antibacteriana dos *Enterococcus* a baixas concentrações de ampicilina é derivada à produção de PBP's de baixa afinidade e também à produção de β -lactamases por algumas espécies de *Enterococcus* (Rice, 2001). A literatura sugere que os *E. faecium* apresentam uma maior taxa de resistência à ampicilina do que os *E. faecalis* em que a percentagem de sensibilidade à ampicilina é alta nestes últimos. No estudo realizado por Hällgren *et al.*, (2001) verificou-se que, num total de 322 isolamentos de *Enterococcus* (244 *E. faecalis*, 74 *E. faecium* e 4 *Enterococcus* de outras espécies) 100% de *E. faecalis* foram sensíveis à ampicilina ao contrário dos *E. faecium* que apresentaram uma taxa de resistência de 74,3%, sendo sensíveis 25,7%. Os autores constataram assim que os *E. faecium* apresentaram uma taxa de resistência à ampicilina muito superior às *E. faecalis*. Garcia-Vázquez *et al.*, (2013) após realização de estudo de sensibilidades bacterianas em isolamentos de *Enterococcus* também concluíram que os *E. faecium* são mais resistentes à ampicilina do que os *E. faecalis*, verificando que a percentagem de *E. faecalis* resistentes à ampicilina era de 1,1% enquanto a percentagem de *E. faecium* resistentes à ampicilina era de 76,9 %. No presente estudo, tal como indicado na Figura 10, os resultados indicam que o *E. faecalis* apresenta uma taxa de resistência de 33,5% e o *E. faecium* uma taxa de resistência de 89,5% à ampicilina para a amostra total. Já em relação à sensibilidade o *E. faecalis* apresentou uma taxa de 66,5% e o *E. faecium* de 10,5%. Para o género masculino e feminino os resultados para a resistência e para a sensibilidade foram semelhantes, com maior taxa de resistência para o *E. faecium* e maior taxa de sensibilidade para o *E. faecalis*.

Os resultados obtidos indicam que o *E. faecium* apresenta um nível de resistência mais elevado à ampicilina e à penicilina G comparativamente ao *E. faecalis*.

Os *Enterococcus* possuem resistências intrínsecas contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos devido à baixa afinidade das PBP's (Murray, 1990). Enquanto a maioria do *E. faecalis* são inibidos por baixas concentrações de antibióticos β -lactâmicos, os *E. faecium* apresentam altos níveis de resistência devido ao excesso de produção de PBP's de baixa afinidade, o que inibe a atuação dos antibióticos β -lactâmicos (Delisle, 2003).

No presente estudo, tal como indicado na Figura 13, os resultados indicam que o *E. faecalis* apresentou uma taxa de sensibilidade de 66,5% para a ampicilina e também para a penicilina G. Por conseguinte, uma taxa de resistência de 33,5% para a ampicilina e para a penicilina G. Em relação ao *E. faecium*, este apresentou uma taxa de sensibilidade de 10,5% para a ampicilina e de 8,8% para a penicilina G, sendo resistentes 89,5% à ampicilina e 91,2% à penicilina G.

Estes dados demonstram a semelhança que existiu no efeito (i.e. igualmente para a resistência e para a sensibilidade) dos dois antibióticos em estudo para ambos os *Enterococcus*. Para o género masculino e feminino os resultados para resistência e para a sensibilidade foram semelhantes, constatando assim que o género não teve influência no efeito dos antibióticos. Através da comparação dos resultados das suscetibilidades antimicrobianas, em ambas as bactérias, parece não existir diferenças entre os dois antibióticos em estudo. A literatura está concordante com os resultados obtidos no estudo da presente tese. Os autores Vázquez *et al.*, (2013) constataram que os *E. faecalis* e os *E. faecium* apresentavam a mesma taxa de resistência quando em contato com iguais concentrações de ampicilina ou de penicilina G, num estudo da prevalência de enterococos numa unidade hospitalar. Sreeja *et al.*, (2012) também constataram que as duas espécies de enterococos isoladas (*E. faecalis* e *E. faecium*) apresentavam a mesma taxa de resistência ou de sensibilidade quando postas em contato com as mesmas concentrações de ampicilina ou de penicilina G.

A presente tese teve como principais limitações: (i) a proveniência das amostras ser de uma só unidade hospitalar; (ii) a percentagem analisada de *E. faecium* ser menor do que a percentagem de *E. faecalis*.

9. CONCLUSÃO

Concluiu-se que ambos os antibióticos (ampicilina e penicilina G) apresentaram um efeito antimicrobiano idêntico quando colocados em contato com as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium*. No entanto, as bactérias tiveram um efeito significativo na administração dos antibióticos, sendo que o *E. faecalis* foi mais sensível e *E. faecium* foi mais resistente, para ambos os antibióticos. O género não teve efeito significativo na administração dos antibióticos, ou seja, os dois antibióticos atuaram da mesma forma independentemente do género.

Como perspectiva futura, poder-se-á testar um leque mais vasto de antibióticos, na bactéria estudada, uma vez que a resistência aos antibióticos tem vindo a aumentar. Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos novos tipos de terapêutica no combate a este tipo de infeções.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012) A review on Antimicrobial Activity of Mushroom. *Planta Médica*, 78(16), 1707-1718.

Baccaro, M. R., Moreno, A. M., Corrêa, A., Ferreira, A. J. P., Calderaro, F. F. (2002). Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69 (2), 15-18.

Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., Aarestrup, F. M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(1-2), 95-112.

Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.H. Thornsberry, C. (1991). Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3): 533-538.

Bomono, R. A., Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2), 49-56.

Bongers, J. H., Franssen, F., Elbers, A. R. W., Tielen, M. J. M. (1995). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from the faecal flora of veterinarians with different professional specialities. *Veterinary quarterly*, 17(4), 146-149.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. (2012). *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. (25ª edição). Porto Alegre: AMGH Editora S.A. e McGraw-Hill Education.

Brown, K. (2004). The history of penicillin from discovery to the drive to production. *Pharmacy in History*, 34(3), 37-43.

Brugueras, M. C., Garcia, M. M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361.

Buynak, J. D. (2004). The discovery and development of modified penicillin- and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 11(14), 1951–1964.

Caiiffa Filho, H. H., Almeida, G. D., Oliveira, G. A., Sarahyba, L., Mamizuka, E. M., Burattini, M. N. (2003). Molecular characterization of Van genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(3), 173-174.

Calderwood, S. B., Moellering, R. C. Jr. (1990). Principles of anti-infective therapy. In: Stein, J. H. (Ed.), *Internal Medicine* (pp. 1202-1218). Boston: Little Brown and Co.

Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant *enterococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686-707.

Chabner, B. A., Brunton, L. L., Knollmann, B. C. (2012). As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gillman. (12ª edição). Rio de Janeiro: McGraw-Hill.

Comerlato, C.B., de Resende, M.C.C., Caierão, J., d’Azevedo, P.A. (2013) Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 590-595.

Deslile S, Perl TM (2003). Vancomycin resistant enterococci. A road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, 123, 504S-18S.

Despacho n.º 14319/2005. D.R II Série. 123 (2005-06-29) 9527.

Devriese, L. A., Collins, M. D., Wirth, R. (1991). *The Genus Enterococcus*. (2ª edição). New York: Springer-Verlag.

Doddamani, P, K., Srikanth., Nandini, T., Rajagopalan, R. (2013). Prevalence and Antibigram of Enterococcus Species in a Tertiary Care Hospital. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2 (5), 2689-2698.

Dunny, G. M., Brown, B. L., Clewell, D. B. (1978). Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(7), 3479-3483.

Eggertson, L. (2007) Hospitals to Report C. difficile and MRSA. *Canadian Medical Association Journal*, 176(10), 1402-1403.

Facklam, R. R., Carvalho, M. G. S., Teixeira, L. M. (2002). *History, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing Of Enterococci*. Washington DC: American Society for Microbiology.

Fennel, C. W., Lindsey, K. L., Mc Gaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E. E., Grace, O. M., Van Staden, J. (2004). Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 205-217.

Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, A., Satta, G. (1994). Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 1980-1983.

Fontana, R., Amalfitano, G., Satta, G. (1992). Mechanisms of resistance growth inhibition and killing by β -lactam antibiotics in *Enterococci*. *Clinical Infectious Diseases*, 15(3), 486-489.

Franke, A. E., Clewell, D. B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 494-502.

Frisby, A.J. (1995). Introduction on the use of the antibiotics. Retirado da Universidade Thomas Jefferson website: <http://jeffline.tju.edu/cwis/oac/antibiotics-guide/intro.html>.

García-Vázquez, E.G., Albendín, H., Hernández-Torres, A., Canteras, M., Yague, G., Ruiz, J., Gómez, J. (2013). Estudio de una cohorte de pacientes con bacteriemias por *Enterococcus* spp. Factores de riesgo para resistencia de alto nivel a aminoglicósidos. *Revista Española Quimioterapia*, 26(3), 203-213.

Gerlach, E.H. (1974). Microdilution 1: A Comparative Study. In: Balows, A. (Ed.), *Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing* (pp. 63-76). Springfield, ILL: Charles C. Thomas Publisher.

Giraffa, G. (2002). *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163-171.

Gray, J.W., Stewart, D. & Pedler, S. J. (1991). Species Identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 1943-5.

Grayson, M. L., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C. B., Ruoff, K. L., De Girolami, P. C., Ferraro, M. J. *et al.* (1991). Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22- year review at one institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 2180-4.

Hällgren, A., Abednazari, H., Ekdahl, C., Hanberger, H., Nilson, M., Samuelsson, A., Svensson, E., Nilson, L.E. (2001). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(1), 53-62.

Hashimoto, T., Hashimoto, S., Matsuzaki, M., Sekiguchi, Y., Hashimoto, Y., Asao, M., Takagi, M. (2012). Investigation of Whether CLSI Broth Microdilution Method is Applicable for MICs Determination of *Enterococcus* spp. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 53(5), 225-32.

Herman, D, J., Gerding, D, N. (1991). Screening and Treatment of Infections Caused by Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 215-219.

Huycke, M. M., Sahm, D. F., Gilmore, M. S. (1998). Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Disease journal*, 4(2), 239-249.

Hollenbeck, B. L., Rice. L. B. (2013). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence Landes Biociencia*, 3(5): 421-433.

Jorgensen, J. H. (1993). Selection Criteria for an Antimicrobial Susceptibility Testing System. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(11), 2841-2844.

Kocaoglu, O., Carlson, EE. (2013). Penicillin-Binding protein imaging probes. *Current Protocols in chemical biology*, 1;5(4), 239-250.

Kohler, W. (2007).The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 133-150.

Ligozzi, M., Aldegheri, M., Predari, S. C., Fontana, R. (1991). Detection of penicillin-binding proteins immunologically related to penicillin-binding protein 5 of *Enterococcus hirae* ATCC 9790 in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 67(3), 335-339.

Liu, D. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens*.(1ª edição). Boca Raton: Taylor and Francis CRC Press.

MacLowry, J.D., Marsh, H.H. (1968).Semi-automatic microtechnique for serial dilution antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory.*The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*,72, 685-687.

Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D.(2005). Enterococcal resistance-an overview.*Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(4), 214-9.

McDonald, M., Blondeau, J. M. (2010).Emerging antibiotic resistance in ocular infections and the role of fluoroquinolones.*Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 36(9), 1588-1598.

Moellering, R. C. Jr. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 14(6), 1173-1176.

Moreno, F., M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.

Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gillmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 13(4), 513-522.

Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46-65.

Murray, B. E. (2000). Vancomycin-Resistant *Enterococcal* Infections. *The New England Journal of Medicine*, 342(10), 710-721.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2006). *Microbiologia Médica* (5ª edição). Rio de Janeiro: Elsevier Editora.

Nijsten, R., London, N., Bogaard, A., Stobberingh, V. D. (1993). Antibiotic resistance of *enterobacteriaceae* isolated from the faecal flora of fattening pigs. *Veterinary quarterly*, 15(4), 152-157.

Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., Densen, A. (2013). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Science*, doi: 10.1002/pro.2414.

Noga, E. J., Silphaduang U. (2003). Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News & Perspectives*, 16(2): 87-92.

Nomura, E., Uchimi, K., Abue, M., Kon, H., Noguchi, T., Susuki, S., Susuki, M., Onodera, H., Tateno, H., Ota, Y. (2010). Regression of MALT lymphoma of the rectum after *Helicobacter pylori* eradication therapy in a patient negative for *Helicobacter pylori*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 107(9), 1466-1473.

Ogier, J. C., Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 291-301.

Ono, S., Muratani, T., Matsumoto, T. (2005). Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2954-2958.

Perez-Trallero, E., Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 520-529.

Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M., Ohara, M. T. (2003). *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos* (2ª edição). São Paulo: Atheneu Editora.

Rice, L. B. (2001) Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (2), 183-187.

Rice, L. B., Bellais, S., Carias, L. L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R. A., Caspers, P., Page, M. G. P., Gutmann, L. (2004). Impact of specific pbp5 mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 3028-3032.

Sande, M. A., Kapusnik-Uner, J.E., Mandell, G.L. (1993). Agentes antimicrobianos. Consideraciones generales. In: Goodman, A., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (Eds.), *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (pp. 991-1017). México: Editorial Médica Panamericana.

Schindler, B. (2007). Worldwide Spread of Resistent *Staphylococcus*. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 30(4), 155-156.

Seija, V., Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. In Bado, I., Garcia, V., Robino, L., Cordeiro, N. F., Seija, V., Vignoli, R. (Eds.), *Temas de bacteriología y virología médica* (pp. 631-647). Montevideo: Oficina del libro FEFMUR.

Sousa, J. C. (2001). *Antibióticos Anti-bacterianos* (1.º edição). Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Sousa, J. C. (2005). *Manual de Antibióticos Antibacterianos* (1.º edição). Porto: Fundação Universidade Fernando Pessoa.

Sousa, J. C. F., Ferreira, W. C. (1998). *Microbiologia Volume 1*. Lisboa: LIDEL Edições Técnicas.

Sreeja, S., Babu, P.R.S., Prathab, A.G. (2012). The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical and Diagnostical Research*, 6(9): 1486-1488.

Webster, C. R. L. (2001). *Farmacologia Clínica em Medicina Veterenária*. São Paulo: Editora ROCA LTDA.

Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Hindler, J. F., Low, D. E., Sheehan, D. J., Tenover, F. C., Turnidge, J. D., Weinstein, M. P., Zimmer, B. L. (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Witte, W., Wirth, R., Klare, I. (1999). *Enterococci*. *Chemotherapy*, 45(2), 135-145.

Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A. M., Karlowsky, J. A. (2007). Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*, 6(7), 1027-1052.

11. ANEXOS