



Perfis de resistência a agentes antimicrobianos de 5 estirpes do género Mycobacterium isoladas de ambiente Hospitalar

Diogo José Pereira Reis

2014



Perfis de resistência a agentes antimicrobianos de 5 estirpes do género Mycobacterium isoladas de ambiente Hospitalar

Diogo José Pereira Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação do Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas e co-orientação da Doutora Clélia Neves Afonso

2014

“Copyright” em nome do estudante, da ESTM e do IPL

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projecto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao Doutor Nuno Empadinhas por me ter aceitado no seu grupo, oferecido condições de trabalho e financiamento, orientado o meu trabalho, estando sempre disponível para partilhar conhecimentos relevantes e debater novas estratégias de abordagem ao trabalho. Acima de tudo agradeço a confiança depositada, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

Às Doutoras Susana Alarico e Sónia Gonçalves Pereira pela orientação, constante disponibilidade em me ensinar e por todo o tempo dispensado com valiosas indicações e ajudas na elaboração de todo o trabalho.

À coordenadora do projecto Prof. Doutora Paula V. Morais do Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra e aos colegas Pedro Abreu e Pedro Farias pela colaboração nas amostragens.

À Prof. Doutora Olga Cardoso pela confiança e acolhimento nas instalações da FFUC e ofereceu as condições para realizar o trabalho.

À Ana Maranha e à Daniela Costa por todo o contributo e importante participação no trabalho de investigação.

À Direcção do Centro de Neurociências e Biologia Celular pela possibilidade de realização deste trabalho de investigação nas suas instalações.

À Direcção do Centro Hospitalar Tondela-Viseu E.P.E., pela possibilidade de realização de amostragens; ao Dr. Eduardo Melo, Comissão de Controlo de Infecção e Resistência aos Antimicrobianos, pela dedicação pessoal e acompanhamento científico e logístico no projecto; à equipa de Enfermagem pela disponibilidade demonstrada.

À Direcção do Centro Hospitalar Universidade de Coimbra E.P.E pela possibilidade de realização de amostragens; Ao Conselho de Administração da Unidade de Inovação e Desenvolvimento, Centro de Ensaio Clínicos, pela autorização de realização do projecto; à equipa de Enfermagem pela disponibilidade.

À Prof. Ana Almeida e Instituto Piaget, Escola - Campus Académico de Silves por apoio financeiro para aquisição de reagentes.

A todos os elementos do grupo de Micobacteriologia Molecular pela paciência, companheirismo e espírito de entajuda que criamos todos os dias.

A todos os membros de BRM/GIRM e MMYRG pelo companheirismo ao longo do mestrado.

À D. Isabel e ao grupo do café da manhã pelo companheirismo, apoio, disponibilidade e motivação para o dia-a-dia.

Ao grupo de futebol nocturno pelos momentos de descontração e divertimento necessários que ajudaram na motivação.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio absoluto e incentivo constante todos os dias.

À Marta, pelo amor, carinho e companheirismo. Pelo incansável apoio, compreensão e, sobretudo paciência, que contribuíram para que fosse possível a concretização deste objectivo.

A todos vós um grande e sincero obrigado!

Resumo

As infecções nosocomiais têm aumentado ao longo dos anos, resultando num aumento do tempo de permanência do doente no hospital, e permanecem como elevada causa de elevada morbidade e mortalidade.

As micobactérias são organismos que se encontram amplamente distribuídos no meio ambiente (*M. mucogenicum*, *M. obuense* e *M. gordonae*), incluindo, habitats marinhos (*Mycobacterium marinum*), sendo muitos deles patogénicos de mamíferos, e causadores de diferentes patologias, como a Lepra e a Tuberculose. *M. marinum* causa uma doença sistémica tal como tuberculose em peixes e pode causar infecções da pele em seres humanos (Granuloma de Aquário) que se podem propagar para estruturas mais profundas como ossos (osteomielite). Enquanto que *M. obuense* é causador de infecções do tracto respiratório, *M. mucogenicum* e *M. gordonae* promovem bacteremias.

Este estudo teve como principal objectivo a identificação das populações bacterianas e o seu isolamento, em particular micobactérias ambientais em dois hospitais, que sabe serem responsáveis, cada vez mais por infecções atípicas como bacteremias (*M. mucogenicum* e *M. gordonae*), infecções pulmonares (*M. obuense*) e infecções cutâneas (*M. marinum*). Pretendeu-se também avaliar a resistência aos antibióticos e desinfectantes comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT) através do cálculo da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para aferir os perfis de resistência.

Os resultados deste estudo demonstram a identificação de 186 espécies de bactérias em dois hospitais amostrados das quais se identificaram 5 estirpes de micobactérias – “*M. gardoniae*” (10AIII, 29AIII e 35AIII), “*M. obuense*” (22DIII) e “*M. mucogenicum*” (24AIII). Das 5 estirpes de micobactérias identificadas “*M. gardoniae*” 10AIII apresenta perfil de resistência ao imipenemo (CMI = 16 mg/L); “*M. gardoniae*” 29AIII apresenta perfil de resistência à claritromicina (CMI = 8 mg/L) e “*M. gardoniae*” 35AIII apresenta, por sua vez, apenas perfil de susceptibilidade intermédia ao imipenem (CMI = 8 mg/L). *M. obuense* 22DIII apresenta perfil de resistência ao imipenem (CMI = 32 mg/L), à tobramicina (CMI=32 mg/L) e à ciprofloxacina (CMI = 8 mg/L). “*M. mucogenicum*” apresenta perfil de resistência ao sulfametoxazol (CMI > 128 mg/L), à doxiciclina (CMI>64 mg/L), à tobramicina (CMI=16 mg/L) e à ciprofloxacina (CMI=4 mg/L).

Em conclusão pôde-se verificar que além da presença de um grande leque de bactérias capazes de causar infecções nosocomiais nos hospitais, MNT também existem na forma multirresistente, o que revela uma problemática a ter em atenção. Esta requer mais estudo dos mecanismos de resistência e da sua disseminação, e obtenção de novos medicamentos com novos alvos, mais eficazes para combater as estirpes multirresistentes que ao longo dos anos tem aumentado.

Palavras-chave: *Mycobacterium*; Micobactéria; Nosocomial; Infecção; Resistência; Isolamento;

Abstract

Nosocomial infections have increased over the years, resulting in increased length of staying of the patient in the hospital, and remain as cause of high morbidity and mortality.

Mycobacteria are organisms that are widely distributed in the environment (*M. mucogenicum*, *M. obuense* and *M. gordonae*), including marine habitats (as *Mycobacterium marinum*), and many are pathogenic to mammals, causing different pathologies as Leprosy and Tuberculosis. *M. marinum* causes a systemic disease such as tuberculosis in fish and may cause skin infections in humans (Aquarium granuloma) which can propagate to deeper structures as bone (osteomyelitis). While *M. obuense* causes respiratory tract infections, *M. gordonae* and *M. mucogenicum* promote bacteremia.

This study's main objective was the isolation and identification of bacterial populations, in particularly environmental mycobacteria in two hospitals. It is also intended to evaluate the resistance to antibiotics and disinfectants commonly used in the treatment of infections caused by non tuberculous mycobacteria (MNT) by calculating the Minimum Inhibitory Concentration (CMI) to measure the resistance profiles.

The results of this study demonstrate the identification of 186 species of bacteria in two hospitals sampled including 5 strains of mycobacteria identified – “*M. gordonae*” (10AIII, 29AIII and 35AIII), “*M. obuense*” (22DIII) and “*M. mucogenicum*” (24AIII). 5 strains of identified mycobacteria, “*M. gordonae*” 10AIII profile presents resistance to imipenem (MIC = 16 mg/L); “*M. gordonae*” 29AIII to clarithromycin (MIC = 8 mg/L) and “*M. gordonae*” 35AIII presents, only a profile of intermediate susceptibility to imipenem (MIC = 8 mg/L). “*M. obuense*” 22DIII shows a resistance profile to imipenem (MIC = 32 mg/L), tobramycin (MIC = 32 mg/L) and ciprofloxacin (MIC = 8 mg/L). “*M. mucogenicum*” profile has resistance to sulfamethoxazole (MIC > 128 mg/L), doxycycline (MIC > 64 mg/L), tobramycin (MIC = 16 mg/L) and ciprofloxacin (MIC = 4 mg/L).

In conclusion, besides the presence of a wide range of bacteria capable of causing nosocomial infections in hospitals, MNT also exist in a multidrug-resistant

form, which reveals an issue to keep in mind. This requires further study of the resistance mechanisms and its dissemination, and obtaining new drugs with new targets, more effective to combat multidrug-resistant strains that has increased over the years.

Keywords: *Mycobacterium*; Mycobacteria; Nosocomial; Infection; Resistance; Isolation;

Índice

| | |
|--|-----|
| Direitos de Cópia | ii |
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | v |
| Abstract | vii |
| Índice de Figuras | x |
| Índice de Tabelas | xi |
| Lista de Abreviaturas | xii |
| | |
| 1. Introdução Geral | 2 |
| 1.1. Infecções nosocomiais: um problema emergente | 2 |
| 1.1.1. Os principais agentes infecciosos: como se transmitem e persistem | 4 |
| 1.2. O género <i>Mycobacterium</i> | 5 |
| 1.2.1. Micobactérias não tuberculosas (NTM): infecções atípicas | 7 |
| 1.3. Mecanismos de resistência a antibióticos | 9 |
| 1.3.1. A função da parede celular na resistência a antibióticos | 11 |
| 1.4. O papel da antibioterapia no aparecimento das micobactérias multirresistentes | 12 |
| 1.5. Objectivo | 14 |
| 2. Materiais e Métodos | 16 |
| 2.1. Locais de amostragem e condições de isolamento | 16 |
| 2.2. Extração de ADN genómico | 19 |
| 2.3. Reacção em cadeia da polimerase (PCR) | 20 |
| 2.4. Visualização dos produtos de PCR por eletroforese de gel de agarose | 21 |
| 2.5. Teste de susceptibilidade a antibióticos | 22 |
| 2.6. Teste de susceptibilidade das micobactérias a desinfectantes | 23 |
| 3. Resultados | 26 |
| 3.1. Análise das sequências do gene que codifica o RNAr <i>16S</i> | 26 |
| 3.2. Antibiogramas | 33 |
| 3.2.1. Testes de susceptibilidade das micobactérias a antibióticos | 33 |
| 3.2.2. Testes de susceptibilidade das micobactérias a desinfectantes | 36 |
| 4. Discussão de Resultados | 38 |
| 4.1. Considerações finais | 42 |
| 5. Referências Bibliográficas | 45 |
| 6. Anexos | 52 |
| 6.1. Meios de cultura para bactérias | 52 |
| 6.1.1. Mistura de antibióticos PANTA | 52 |
| 6.1.2. Solução de enriquecimento de OADC | 52 |
| 6.1.3. Meio de isolamento | 52 |
| 6.2. Soluções para extração de ADN genómico | 53 |
| 6.2.1. Tampão de lise (reagente GES) | 53 |
| 6.3. Electroforese em gel de agarose 1 e 2% | 53 |
| 6.3.1. Tampão TAE 50x | 53 |
| 6.3.2. Gel de agarose 1 e 2% | 53 |

Índice de figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1.1 | Variação da taxa de infecções nosocomiais após dias de permanência em ambiente hospitalar (extraído de DGS, 2012) | 3 |
| Figura 1.2 | Representação esquemática da árvore filogenética do género <i>Mycobacterium</i> construído a partir das sequências do gene 16S (extraído de Devulder <i>et al.</i> , 2005) | 6 |
| Figura 1.3 | Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana (http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1027479/antibiotic-resistance) | 9 |
| Figura 1.4 | Esquematização de corte transversal da secção da estrutura da parede celular micobacteriana (extraído de Kaiser, 2011) | 11 |
| Figura 3.1 | Identificação dos géneros presentes nas amostras dos três isolamentos efectuados no Hospital 1, com base na homologia das sequências do gene DNAr <i>16S</i> das estirpes isoladas. | 27 |
| Figura 3.2 | Identificação dos géneros presentes nas amostras dos três isolamentos efectuados no Hospital 2, com base na homologia das sequências do gene DNAr <i>16S</i> das estirpes isoladas. | 28 |
| Figura 3.3 | Identificação das Classes de bactérias presentes nas amostras recolhidas dos dois hospitais | 29 |

Índice de tabelas

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1.1 | Lista de fármacos geralmente usados no tratamento de infecções e os seus alvos nas bactérias (adaptado de WHO, 2002) | 13 |
| Tabela 2.1 | Lista dos locais amostrados no Hospital 1 | 16 |
| Tabela 2.2 | Lista dos locais amostrados no Hospital 2 | 18 |
| Tabela 2.3 | Identificação das concentrações/diluições dos antibióticos usadas nos antibiogramas | 23 |
| Tabela 2.4 | Tipos de desinfetantes fornecidos por Hospitais, utilizados no teste de resistência das micobactérias isoladas | 23 |
| Tabela 3.1 | Cinco estirpes pertencentes ao género <i>Mycobacterium</i> que foram isoladas nas amostras do Hospital 1 (3º isolamento). | 30 |
| Tabela 3.2 | Sequências dos genes DNAr 16S, rpoB e hsp65 obtidas por sequenciação bi-direcional. Os cinco isolados foram identificados como estirpes do género <i>Mycobacterium</i> com base na homologia das sequências | 31 |
| Tabela 3.3 | Concentrações inibitórias de crescimento (CMIs) (mg/L) das cinco micobactérias isoladas do Hospital 1, relativamente a antibióticos abrangidos pelas normas CLSI (2003) | 34 |
| Tabela 3.4 | Concentrações inibitórias de crescimento (CMIs) (mg/L) de antibióticos não abrangidos pelas normas CLSI (2003) de cinco micobactérias isoladas do Hospital 1 | 35 |
| Tabela 3.5 | Diluições mínimas inibitórias de crescimento dos desinfetantes, referentes às cinco micobactérias isoladas do Hospital 1 | 36 |
| Tabela 6.1 | Formulação da mistura de antibióticos PANTA | 52 |
| Tabela 6.2 | Formulação da solução de enriquecimento OADC | 52 |
| Tabela 6.3 | Formulação do meio cultura de isolamento de bactérias | 52 |
| Tabela 6.4 | Formulação da solução TAE 50x | 53 |
| Tabela 6.5 | Formulação do gel de agarose 1%. | 53 |
| Tabela 6.6 | Formulação do gel de agarose 2% | 54 |

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

ATB – Antibiótico

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CD4+ - Cluster of differentiation 4

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CTAB – Brometo de Cetrimónio

DMSO - Dimetilsulfóxido

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

M. – *Mycobacterium*

MDR – Multirresistência a fármacos

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MH - Muller-Hinton

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MNT – Micobactérias Não Tuberculosas

NaCl – Cloreto de Sódio

OADC - Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase

TB – Tuberculose

TES - N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid

TX – Transplante

U – unidades

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

WHO – World Health Organization

Capítulo I

Introdução

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

1 – Introdução Geral

1.1 Infecções nosocomiais: um problema emergente

As infecções adquiridas em ambiente hospitalar, designadas infecções nosocomiais, são infecções adquiridas durante o tratamento do paciente no hospital e que, portanto não estavam presentes ou em período de incubação aquando da admissão do paciente (Inweregbu *et al.*, 2005). Assim, são consideradas nosocomiais, todas as infecções que ocorram num período superior a 48 horas após a admissão do paciente (Inweregbu *et al.*, 2005; *World Health Organization (WHO)*, 2002). Estas infecções são persistentes e permanecem como elevada causa de morbilidade e mortalidade entre os doentes hospitalizados e podem, também, afectar os profissionais de saúde durante o exercício da sua actividade. Os traumatismos, as queimaduras, a falha de vários órgãos, o uso de técnicas invasivas e por outro lado a exposição contínua e sistemática a um elevado número de agentes antimicrobianos são alguns exemplos de situações que originam o aparecimento de várias resistências selectivas, facilitando a colonização, a transmissão e a susceptibilidade de infecção. Estas situações são bastante comuns em pessoas hospitalizadas e as infecções muito difíceis de controlar, levando nalguns casos a septicémias, muitas vezes fatais. (Alharbi & Zayed, 2011).

Segundo Liam Donaldson, Director da Organização Mundial de Saúde (OMS), as infecções nosocomiais são um problema grave e emergente à escala global, mesmo em países mais desenvolvidos. Nos EUA, por exemplo, anualmente ocorrem cerca de 1,7 milhões casos de infecções nosocomiais que resultam em 100 mil mortes, enquanto que na Europa se registam 4,5 milhões de casos de infecções nosocomiais, dos quais 37 mil são fatais (WHO, 2011). Em Portugal, e de acordo com os dados da Comissão de Controlo de Infecção (CCI), a incidência das infecções hospitalares nas Unidades de Medicina foi cerca de 15% na primeira metade da década de 1990, tendo diminuído para cerca de 8% nos anos seguintes. Quanto à taxa global de infecções nosocomiais, esta tem variado nos últimos cinco anos entre 16,4 e 17,6% em doentes internados (CCI 2004, CCI 2007).

Numa outra perspectiva, as infecções nosocomiais agravam a incapacidade funcional e a tensão emocional do doente e, nalguns casos, podem levar a transtornos

que reduzem a qualidade de vida, podendo ainda causar a morte. São uma das principais causas de disfunção e os custos económicos associados são enormes (Eggimann & Pittet, 2001; Ylipalosaari *et al.*, 2006; Ponce-de-Leon, 1991; Wenzel, 1995; Wenzel, 2001; Grundmann *et al.*, 2006).

A estadia prolongada dos doentes com infecções nosocomiais acresce em média 5 a 10 dias ao período de internamento e constitui um factor importante e que contribui para o aumento do custo de internamento (Wenzel, 1995; Pittet & Wenzel, 1995; Fortes *et al.*, 2004; Rocha, 2002; Pittet *et al.*, 1994; Kirkland *et al.*, 1999). Segundo a Direcção Geral de Saúde (DGS), em 2012, as situações de estadia prolongada, contribuíram para o aparecimento de 27.5% de infecções nosocomiais na primeira semana de permanência hospitalar e a partir da terceira semana para o aparecimento de 32.4% de infecções nosocomiais (figura 1.1).

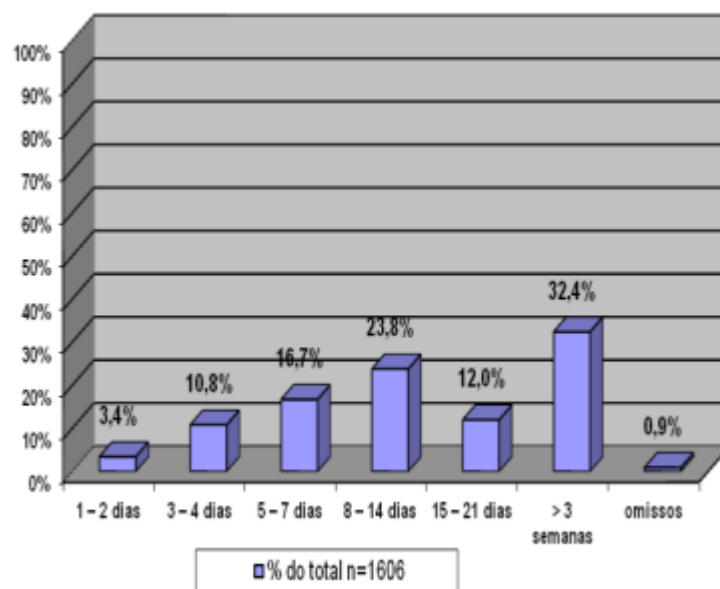


Figura 1.1 – Variação da taxa de infecções nosocomiais após dias de permanência em ambiente hospitalar (extraído de DGS, 2012)

Os quatro tipos de infecção mais frequentes, contabilizando mais de 80% da totalidade das infecções nosocomiais são as infecções do tracto urinário, as infecções de feridas cirúrgicas, infecções respiratórias e as infecções relacionadas com o uso de dispositivos vasculares (Ducel *et al.*, 2003, Emori & Gaines, 1993). Um quarto das

infecções nosocomiais envolvem doentes das unidades de cuidados intensivos (UCI) e quase 70% são devido a microorganismos multirresistentes (Burke, 2003).

1.1.1 Os principais agentes infecciosos: como se transmitem e persistem

Os ambientes hospitalares podem actuar como reserva para alguns dos agentes patogénicos causadores de infecções nosocomiais importantes (Abreu *et al.*, 2014). A maioria das infecções nosocomiais é causada por bactérias pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Acinetobacter* e *Mycobacterium* (WHO, 2002), por vírus, menos frequentemente por fungos e, raramente, por parasitas. Uma das características importantes do agente é a sua patogenicidade, isto é, a sua capacidade de causar doença. Esta patogenicidade é representada pela virulência e capacidade de invadir os tecidos [Programa Nacional de Controlo de Infecção (PNCI), 2003; PNCI, 2006].

A transmissão destes agentes da fonte até ao hospedeiro pode ser através do contacto directo ou indirecto, por via aérea ou através de vectores. Os microorganismos podem ter mais que uma via de transmissão. Para além das vias de transmissão referidas, os procedimentos invasivos criam portas de entrada na medida em que ultrapassam as barreiras naturais de protecção do indivíduo e expõem ao contacto com o exterior locais normalmente protegidos (PNCI, 2003; 2006). Esta transmissão, poderá acontecer, não só, durante o tratamento dos pacientes, mas também em processos de higiene e na utilização de casas de banho. Os ventiladores e/ou ar condicionados, também proporcionam uma excelente fonte de transmissão através das poeiras libertadas para o ar, que poderá contaminar objectos ou até entrar nas vias respiratórias dos pacientes, infectando-os (WHO, 2002). Outra situação que contribui para a prevalência e a dificuldade de controlar este tipo de infecções são os doentes com defesas diminuídas, quer devido à idade avançada, múltiplas doenças subjacentes ou a terapêuticas depressoras do sistema imunitário (Monteiro, 1993).

1.2 O género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* é constituído actualmente por cerca de 169 espécies (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>), pertence à ordem *Actinomycetales*, classe *Actinobacteria*, e família *Mycobacteriaceae*. As micobactérias são aeróbias, apresentam a forma de bastonetes, são bactérias ácido-álcool resistentes e não apresentam motilidade (Nobre *et al.*, 2014), com a excepção de *Mycobacterium marinum*. As micobactérias conseguem crescer em meio mínimo tendo em substratos simples como únicas fontes de azoto e carbono como aminoácidos e glicerol, respetivamente. A temperatura óptima de crescimento varia entre 30 e 45°C e algumas espécies conseguem ainda crescer a 52°C e 65°C como é o caso das espécies *M. hassiacum* e *M. thermoresistibile* (Pfyffer, 2007; Schroder *et al.*, 1997)

As micobactérias, podem ser classificadas em dois grupos: micobactérias de crescimento rápido, aquelas que formam colónias visíveis a olho nú após sete dias de incubação das culturas e micobactérias de crescimento lento, as necessitam de mais tempo de incubação para que seja visível o aparecimento de colónias (figura 1.2) (Nobre *et al.*, 2014; Ryan e Ray, 2004).

As espécies do género *Mycobacterium* possuem uma ampla capacidade de adaptação a diferentes ambientes, nomeadamente solos e a ambientes aquáticos, devido à sua resiliência pouco comum a condições de dessecação, temperaturas elevadas, pH baixo, presença de metais pesados e de desinfetantes (Gemma, *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2014).

A parede celular das micobactérias apresenta uma estrutura única, rica em lípidos e que as distingue das restantes bactérias (figura 1.4). A parede celular tem um papel fundamental e determinante na capacidade de adaptação das micobactérias a condições adversas no ambiente e também dentro do hospedeiro (Falkinham, 2009; Yang *et al.*, 2014).

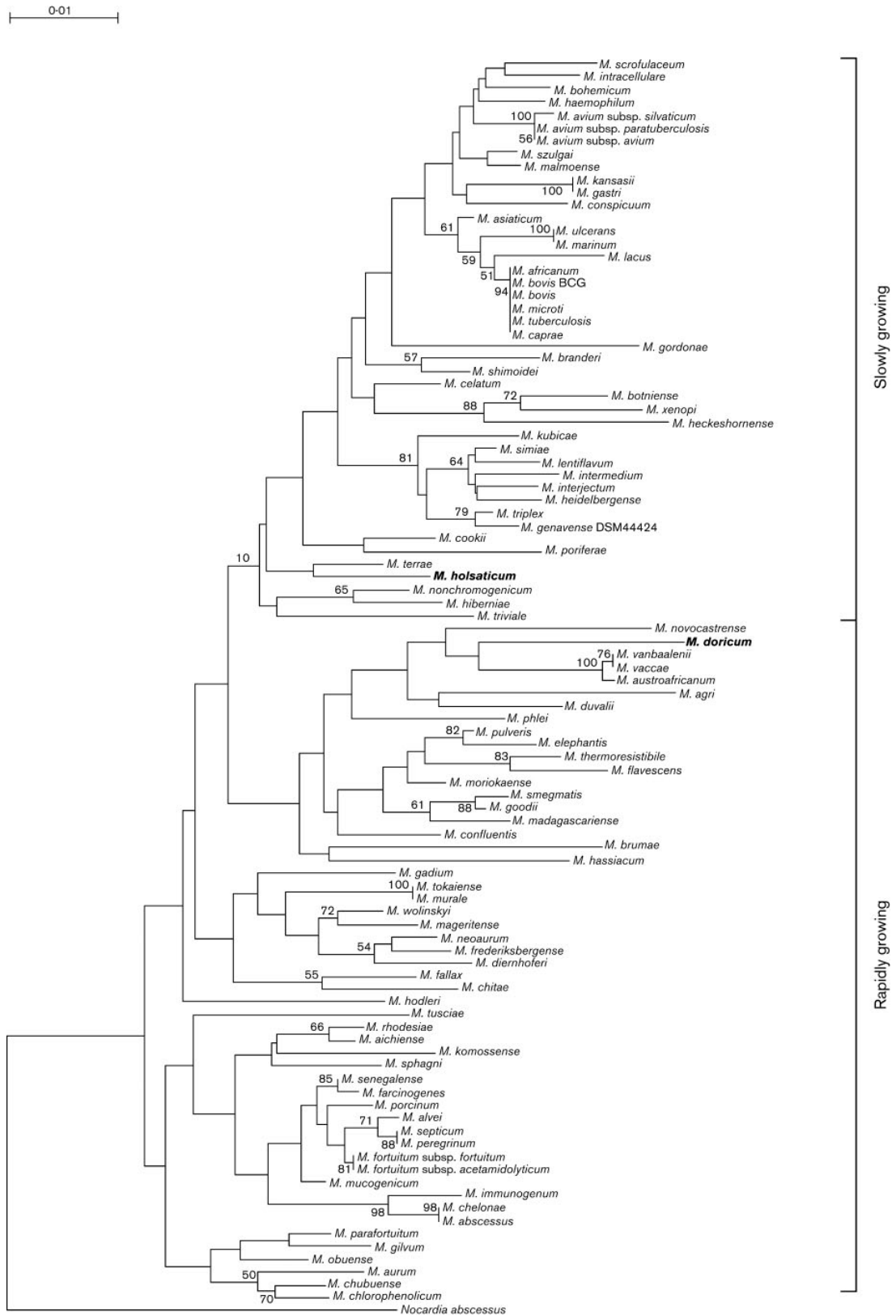


Figura 1.2 - Árvore filogenética do género *Mycobacterium* construída com base nas sequências do gene que codifica o RNAr 16S (extraído de Devulder *et al.*, 2005).

1.2.1 Micobactérias não tuberculosas (MNT): infecções atípicas

Mycobacterium tuberculosis é o principal agente responsável pela tuberculose (TB), uma doença pulmonar infecciosa (também provocada por *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* e *M. orygis*). O seu controlo e erradicação são uma prioridade e reúnem os esforços das organizações de saúde a nível mundial (Roberts *et al.*, 2012; Wellington *et al.*, 2013). Actualmente, a OMS estima que um terço da população mundial se encontra infectada por este agente patogénico. Deste modo, o conhecimento detalhado da fisiologia, genética e distribuição geográfica das micobactérias causadoras de tuberculose tem-se tornado de grande importância. (Lopes *et al.*, 2013). Além das espécies causadoras da tuberculose, o género *Mycobacterium*, é constituído na sua maioria por espécies ambientais designadas micobactérias não-tuberculosas (MNT) e que podem ser patogénios oportunistas de humanos e vários tipos de animais como peixes e aves. (Falkinham 1996, 2002; Wayne & Sramek 1992; Biet *et al.*, 2005). As MNT habitam normalmente uma grande variedade de ambientes naturais e artificiais, nomeadamente águas naturais e sistemas de distribuição de águas doméstico e de hospitais, tornando por isso estes sistemas fontes de infecções por espécies de MNT como *M. marinum*, *M. obuense*, *M. gordonae* e *M. mucogenicum* (Pfyffer, 2007; Falkinham, 2009; Kendall *et al.*, 2011).

As infecções por MNT ocorrem principalmente em indivíduos imunodeprimidos, apesar de indivíduos imunocompetentes também poderem ser infectados (Brown-Elliot & Wallace, 2007; Esteban & Ortiz-Perez, 2009). As infecções em humanos por MNT são principalmente ao nível do sistema respiratório (pulmões), tecido cutâneo (ulceras) e tracto urinário, mas também podem ser infecções generalizadas. Recentemente, o aparecimento de um elevado número de estirpes resistentes a antibióticos e desinfetantes reforça a necessidade urgente de medidas para combater infecções provocadas por estes patógenos (Richmond & Mckinnley, 1999; Pfyffer, 2007; Brown-Elliot & Wallace, 2007; Lewis *et al.*, 2003).

Mycobacterium marinum é uma espécie com a característica única de apresentar motilidade (Ryan & Ray, 2004) e é o principal agente patogénico de infecções na pele (Seymourtier *et al.*, 2004). Esta micobactéria possui uma distribuição global, principalmente em ambientes aquáticos de temperaturas amenas (marinho e de água doce), tendo sido isolada pela primeira vez de um peixe marinho (Aronson, 1926). A temperatura óptima de crescimento desta espécie situa-se entre 30 e 32°C (Gunther, 1977). Em humanos, a principal via de infecção é a superfície cutânea danificada, quer por exemplo devido a queimaduras ou ao uso de instrumentos médicos invasivos (Ucko & Colorni, 2005).

Mycobacterium gordonae é uma espécie de crescimento rápido, frequentemente isolada em hospitais (Reyes-Ruvalcaba *et al.*, 2008). Num estudo realizado, foram identificadas 63% das estirpes isoladas como pertencentes à espécie *M. gordonae*, num sistema de distribuição de água, indicando a proliferação generalizada da espécie neste género de ambiente (Santos *et al.*, 2005), também em hospitais (Galassi *et al.*, 2003; Tobin-D'Angelo *et al.*, 2004; Fernandez-Rendon *et al.*, 2012).

Outra espécie de micobactéria comum em ambiente hospitalar (também de crescimento rápido), é a espécie *M. mucogenicum*, tendo sido isolada do fígado de um paciente com hepatite granulomatosa. Recentemente, a espécie *M. mucogenicum* foi descrita como responsável por infectar um paciente com linfocitopenia CD4+ idiopática com febre prolongada. No entanto, esta espécie tem sido relacionada com infecções nosocomiais e bacteremias, provavelmente devido ao contacto de pacientes com água contaminada (Adenkambi *et al.*, 2006; Livni *et al.*, 2008).

Mycobacterium obuense, é uma espécie de crescimento rápido, isolada pela primeira vez da expectoração de um paciente com uma infecção pulmonar, tendo também revelado certa tolerância ao antibiótico etambutol (5 µg/mL) (Tsukamura & Mizuno, 1971). Outra estirpe pertencente a esta espécie também foi isolada de um paciente internado num hospital rural na Zâmbia (Buijtels *et al.*, 2009)

A permeabilidade da parede celular é essencial para que o antibiótico entre na célula bacteriana e actue (Maris, 1995). A alteração da estrutura da celular, sobretudo por alteração do nº de porinas, tem por objectivo diminuir a penetração do fármaco (Goodman & Gilman's, 2008).

A alteração do local de acção caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao seu local de ligação na célula bacteriana. Esta actividade ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano (através da inibição das enzimas que actuam na sua construção) ou por interferência na síntese de ADN onde ocorrem mutações em regiões específicas nos genes estruturais, que fazem com que o antibiótico não se ligue às enzimas (Dzidic *et al.*, 2007; Rice & Bonomo, 2005; Fluit *et al.*, 2001).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas que ativamente transportam os antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular (Dzidic *et al.*, 2007). Como os antibióticos, designadamente as fluoroquinolonas, necessitam de entrar na célula bacteriana para exercer a sua acção, este mecanismo de resistência envolve a activação de genes que codificam as proteínas que constituem as bombas de efluxo, promovendo a sua activação e aumento do fluxo, levando os antibióticos para o exterior da bactéria, inibindo a sua acção (Dzidic *et al.*, 2007).

O mecanismo enzimático de resistência aos antibióticos baseia-se em três tipos de acções: hidrólise dos antibióticos, quando na sua estrutura possuem grupos amidas e ésteres, susceptíveis à quebra das ligações destes grupos pelas hidrolases excretadas pelas bactérias para actuarem antes de os antibióticos atingirem o alvo. Outro tipo de acção é a transferência de grupos químicos (como fosforil ou acetil) para os antibióticos, comprometendo a sua ligação ao alvo (Dzidic *et al.*, 2007; Rice & Bonomo, 2005). O terceiro tipo de acção é um processo de redução ou de oxidação do antibiótico, induzida pela bactéria, inactivando-o (Wright, 2003).

1.3.1 A função da parede celular na resistência a antibióticos

A resistência de diversas espécies de *Mycobacterium* a antibióticos está relacionada com a estrutura da sua parede celular rica em lípidos, característica exclusiva da família *Mycobacteriaceae*, e que lhes confere uma elevada hidrofobicidade, levando a resistência a certos ácidos, alcalinos, detergentes de lise oxidativa e lise por alguns antibióticos (Takayama *et al.*, 2005; Hett & Rubin, 2008; Oduwole, 2008; Stanford & Stanford, 2012; Lopez-Marin, 2012). A parede celular espessa destas espécies tem como principais constituintes o peptidoglicano, um polissacarídeo que ajuda a manter a forma celular, e os ácidos micólicos (figura 1.4), cadeias lipídicas longas e ramificadas com 70 a 90 átomos de carbono, principal constituinte lipídico da parede celular das micobactérias, correspondendo a cerca de 40-60% do seu peso seco total e que contribuem para a sua baixa permeabilidade (Laval *et al.*, 2001). Estas características tornam as micobactérias difíceis de erradicar com práticas de descontaminação comuns (Ortiz-Perez *et al.*, 2011; Stanford & Stanford, 2012).

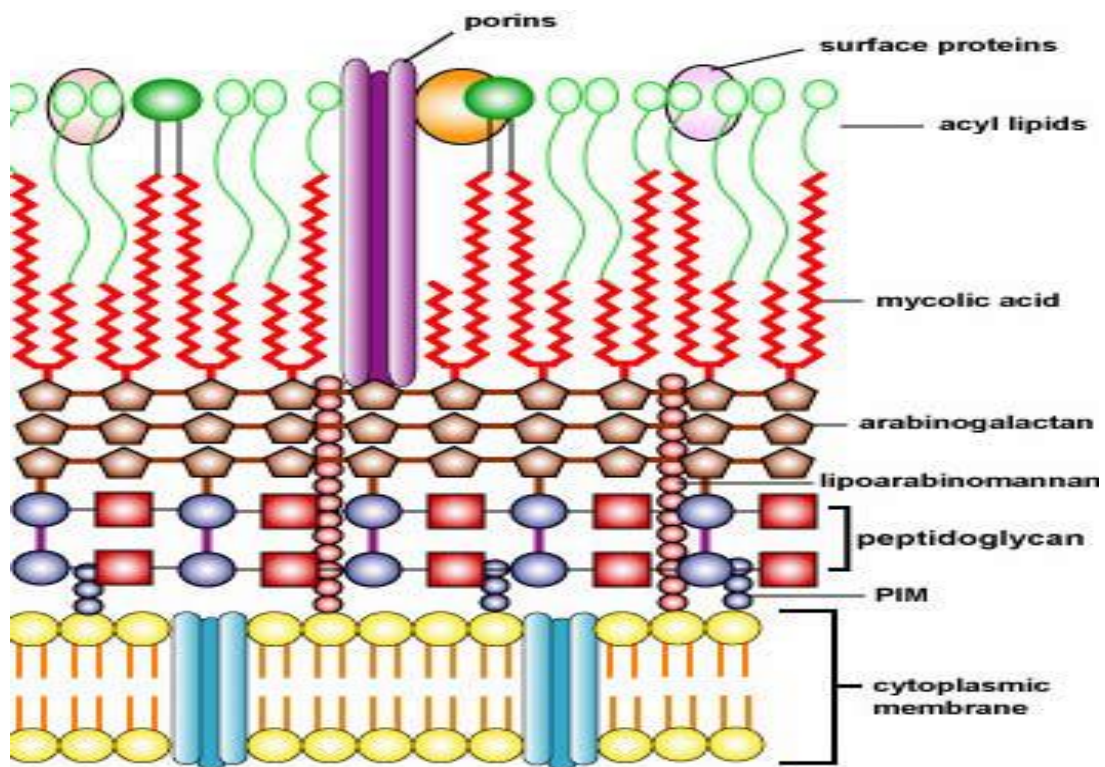


Figura 1.4 – Esquema da estrutura da parede celular de micobactérias (extraído de Kaiser, 2011).

1.4 O papel da antibioterapia no aparecimento de micobactérias multirresistentes

Existem bastantes antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções, como as provocadas por micobactérias (tabela 1.1), mas a sua incorrecta prescrição (administração de doses subóptimas, duração insuficiente do tratamento ou até o mau diagnóstico que leva à escolha inapropriada do fármaco a aplicar) levou ao aparecimento de bactérias resistentes, incluindo micobactérias (WHO, 2002).

Desde os anos 80 a introdução de novos agentes para uso clínico tem diminuído, reflectindo a dificuldade de obtenção de novas drogas e um compromisso reduzido por parte da indústria farmacêutica na descoberta de novas drogas antibacterianas eficazes (Wilson *et al.*, 2004). O surgimento e disseminação de bactérias resistentes são o resultado de muitos anos de pressão selectiva constante das aplicações humanas dos antibióticos. Este não é um processo natural, mas uma situação imposta pelo homem, o que se torna um bom exemplo da teoria Darwiniana da evolução adaptativa das espécies (Davies & Davies, 2010).

Tabela 1.1 - Lista de fármacos geralmente usados no tratamento de infecções por micobactérias e os seus alvos nas bactérias (adaptado de WHO, 2002).

| Grupo | Designação | Efeito |
|------------------------|-------------------|---|
| Beta-lactâmico | Cefoxitina | Síntese da parede celular |
| Aminoglicosídeo | Amicacina | Inibidor de síntese proteica |
| Oxazolidinona | Linezolida | Inibidor de síntese proteica |
| Sulfonamida | Sulfametoxazol | Inibidor na síntese de ácido fólico |
| Beta-lactâmico | Imipenemo | Síntese da parede celular |
| Macrólido | Clarithromicina | Inibidor de síntese proteica (subunidade 50S) |
| Tetraciclina | Doxiciclina | Inibidor de síntese proteica (subunidades 30S/50S) |
| Aminoglicosídeo | Tobramicina | Inibidor de síntese proteica (subunidades 30S/50S) |
| Quinolona | Ciprofloxacina | Inibidor de divisão celular |
| Aminoglicosídeo | Neomicina | Inibidor de síntese proteica |
| Aminoglicosídeo | Espectinomicina | Inibidor de síntese proteica (subunidade 30S) |
| Beta-lactâmico | Ampicilina | Síntese da parede celular |
| Quinolona | Ácido Nalidíxico | Inibidor da subunidade da ADN girase e Topoisomerase IV |
| Polipeptídeo | Polimixina B | Altera a permeabilidade da membrana celular |
| Sulfonamida | Trimethoprim | Inibidor da síntese de ácido tetrahidrofólico |
| Beta-lactâmico | Azlocilina | Síntese da parede celular |
| Aminoglicosídeo | Gentamicina | Inibidor de síntese proteica (subunidade 30S) |
| Aminoglicosídeo | Canamicina | Inibidor de síntese proteica |
| Aminoglicosídeo | Estreptomicina | Inibidor de síntese proteica |
| Anfenicol | Cloranfenicol | Inibidor de síntese proteica |
| Ansamicina | Rifampicina | Bloqueia a síntese de ARN |
| Macrólido | Anfotericina B | Altera a permeabilidade da membrana celular |

1.5 Objectivo

Este estudo teve como principal objectivo o isolamento e identificação de micobactérias presentes em ambiente hospitalar, que se sabe serem responsáveis, cada vez mais, por infecções atípicas, como *M. marinum*.

Pretendeu-se ainda avaliar a resistência destas bactérias a alguns dos antibióticos comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por MNT determinando a Concentração Mínima Inibitória (CMI) para um espectro alargado de antibióticos. Também se pretendeu efectuar um estudo semelhante relativamente a diferentes desinfectantes utilizados na higienização de instrumentos e áreas hospitalares, com o intuito de avaliar a eficácia dos mesmos sobre estas micobactérias.

Capítulo II

Materiais e Métodos

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

2. Materiais e Métodos

2.1 Locais de amostragem e condições de isolamento

A recolha de amostras foi efectuada, em dois Hospitais Centrais da zona centro de Portugal, Hospital 1 e Hospital 2. No Hospital 1 as colheitas foram realizadas em diferentes locais nos Serviços de Hematologia, Urologia, Transplantes (TX) Renais e Medicina A; entre Novembro de 2012 e Janeiro de 2013. No Hospital 2 as colheitas foram realizadas em diferentes locais nos Serviços de Urologia/Hematologia/Vascular, Cirurgia IA e Medicina IIA entre Junho e Setembro de 2013. Os locais de amostragem nos diferentes Serviços estão indicados nas tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1 - Lista dos locais amostrados no Hospital 1.

| Serviço | Local |
|--------------------|-----------------------------------|
| Hematologia | Interruptor wc sala grande |
| | Torneira lavatório wc sala grande |
| | Ralo lavatório wc sala grande |
| | Chuveiro wc sala grande |
| | Cortinado wc sala grande |
| | Mesa de cabeceira |
| | Fundo da cama |
| | Pega suporte cabeceira da cama |
| | Carro de terapêutica |
| | Bancada sala de terapêutica |
| | Torneira sala de terapêutica |
| | Tabuleiro usado |
| | Tabuleiro limpo |
| | Interruptor wc quarto 3 |
| | Torneira wc quarto 3 |
| | Chuveiro wc quarto 3 |
| | Puxador porta sala enfermagem |
| | Entrada da adufa |
| | Saída adufa |
| | Teclado código porta entrada |
| Estátua | |
| Urologia | Torneira lavatório wc sala grande |
| | Ralo lavatório wc sala grande |
| | Chuveiro wc sala grande |
| | Interruptor wc sala grande |
| | Fundo da cama |

| | |
|-------------------|--|
| | Mesa de cabeceira |
| | Carro de terapêutica |
| | Tabuleiro usado |
| | Bancada sala de terapêutica |
| | Torneira sala de terapêutica |
| | Tabuleiro limpo |
| | Teclado computador sala de terapêutica |
| | Arrecadação roupa limpa |
| TX Renais | Fundo da cama |
| | Mesa de cabeceira |
| | Interruptor wc sala grande |
| | Torneira wc sala grande |
| | Chuveiro wc sala grande |
| | Cortinado wc sala grande |
| | Cortinado doentes sala grande |
| | Código de entrada enfermaria |
| | Campainha entrada enfermaria |
| | Carro de terapêutica |
| | Tabuleiro usado |
| | Torneira sala de terapêutica |
| | Bancada sala de terapêutica |
| | Interruptor wc sala grande |
| | Torneira wc sala grande |
| | Chuveiro wc sala grande |
| Medicina A | Cortinado wc sala grande |
| | Fundo da cama |
| | Mesa de cabeceira |
| | Manipulo porta sala trabalho |
| | Tabuleiro limpo |
| | Péga suporte cabeceira da cama |
| | Comando cama |
| | Candeeiro cabeceira de cama |
| | Planta artificial |

Tabela 2.2 - Lista dos locais amostrados no Hospital 2.

| Ala | Divisão | Descrição | |
|------------------------------|---------------------------------|---|---|
| Urolo/Hemato/Vascular | Enfermaria 3 | Apoio cama Mesa cabeceira Candeeiro Torneira Cortinado | |
| | Sala enfermagem | Bancada Caixa medicamentos | |
| | Antecâmara de quarto isolamento | Pega torneira Maçaneta porta | |
| | Banho assistido | Apoios sanita Cama | |
| | Sujos | Maçaneta porta | |
| | Armazém | Prateleira (junto caixas de cartão) | |
| | Móvel | Carro terapêutica Medidor de pressão arterial | |
| | UCI | Cama Lavatório metal Pega cama Mesa de trabalho Torneira (lavatório cerâmica) | |
| | Cirurgia IA | Antecâmara de quarto isolamento | Colchão desinfectado Maçaneta porta Desinfectante |
| | | Móvel | Carro terapêutica Tabuleiro refeições |
| | | Sala enfermagem | Caixa medicamentos |
| | | Enfermaria 3 | Apoio cama Mesa cabeceira Torneira |
| Banho assistido | | Apoios sanita Cama | |
| Sujos | | Maçaneta porta | |
| Medicina IIA | Limpos (armazém) | Prateleira | |
| | Sala enfermagem | Bancada | |
| | Móvel | Caixa medicamentos Carro terapêutica Medidor pressão arterial | |
| | Antecâmara de quarto isolamento | Maçaneta porta Gel mãos | |
| | Corredor (enfermaria 4) | Interruptor | |

| | |
|------------------|-------------------------------------|
| Enfermaria 3 | Apoio cama |
| | Torneira |
| | Mesa cabeceira |
| | Cortinado |
| | Candeeiro |
| Banho assistido | Apoio de cadeira |
| | Cama |
| Sujos | Maçaneta porta |
| Limpos (armazém) | Prateleira (junto caixas de cartão) |
| Posto enfermagem | Teclado |
| | Telefone |

Em cada local, as amostragens foram efectuadas assepticamente com uma zaragatoa embebida numa solução de água peptonada (Peptona 1% e NaCl 0.5%) e posteriormente, no laboratório, no interior de uma câmara de fluxo (NUAIRE laminar flow products) procedeu-se à inoculação de cada amostra em placas de Petri com meio *Middlebrook 7H10 agar* (BD, Difco) (Anexos, secção 6.1). Este meio foi enriquecido com 10% de Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase (OADC) (Anexos, secção 6.1) e suplementado com uma mistura de antibióticos Polimixina B, Azlocilina, Ácido Nalidixico, Trimethoprim e Anfotericina B (PANTA) (Anexos, secção 6.1). Depois de inoculadas as placas foram incubadas a 30°C. Semanalmente e durante 1 mês procedeu-se ao registo do aspecto, cor e quantidade de colónias em cada placa.

Cada colónia seleccionada foi repicada para uma nova placa com meio de cultura (descrito em cima) de modo a obter culturas puras. Uma parte da biomassa da cultura de cada isolado foi recolhida para um tubo de congelamento contendo meio *Middlebrook 7H9 broth* com 15% de glicerol e armazenada a -80°C, outra parte da biomassa foi recolhida para um tubo eppendorf contendo o tampão apropriado para posterior extracção de ADN.

2.2 Extracção de ADN genómico

O ADN genómico de cada isolado foi obtido segundo o protocolo de Nielsen *et al.* (1995), alterando o passo inicial de lise celular, o qual foi feito em tampão GTE (50

mM glucose, 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 e 10 mM EDTA) contendo lisozima (20 mg/mL) e incubando as amostras a 37°C com agitação (120 rpm). À solução de lisado obtido no passo anterior adicionaram-se 300 µL de tampão GES (EDTA 2 mM, pH 8, 60% de tiocianato de guanidínio e 12.5% de SDS), que foi misturada recorrendo ao vórtex e o microtubo foi incubado em gelo durante 10 minutos. As amostras foram de seguida incubadas com RNAase (Qiagene) de modo a obter uma concentração final de 0.125 mg/mL, o microtubo foi invertido algumas vezes de modo a misturar suavemente o seu conteúdo e foi incubado a 37 °C durante 60 minutos. Foi adicionada Proteinase K (Sigma-Aldrich) de modo a obter uma concentração final de 0.07 mg/mL, o microtubo foi invertido algumas vezes de modo a misturar suavemente o seu conteúdo e foi incubado a 37 °C durante 50 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 250 µL de acetato de amónia a 7.5 M, recorreu-se ao vórtex para misturar e o microtubo foi incubado em gelo durante 10 minutos. Foi adicionado 0.1 volumes do tampão de extracção com CTAB (Biosciences) (1% de CTAB; 0.7 M de NaCl) e incubado a 65 °C durante 20 minutos. Seguidamente, foram adicionados 800 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (Biochemica) e recorreu-se ao vórtex para misturar de forma a obter um preparado homogéneo. Foi necessário centrifugar (13000 x g, 10 minutos) e remover a fase aquosa para um novo microtubo. O ADN foi então precipitado com isopropanol (0.54 volumes) e foi efectuada uma nova centrifugação (13000 x g, 5 minutos). Finalmente, foi necessário lavar o ADN com 1 mL de etanol duas vezes, secar e ressuspender em 50-100 µL de água estéril.

2.3 Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Amplificou-se o gene que codifica o RNAr *16S* de cada isolado com o par de primers “forward” 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e “reverse” 1525R (AAGGAGGTGWTCCARCC), usando o kit “Supreme NZYTaQ DNA polymerase” (NZYTech), com a seguinte mistura de reacção (50 µL): tampão de reacção 10x, MgCl₂ 50 mM, solução de dNTPs 10 mM, primers 0.5 µM, 0.15 µg de ADN, 2.5 U de “Supreme NZYTaQ DNA polymerase”. O perfil de ciclos de temperatura foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 segundos, *annealing* a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. O passo final de elongação foi feito a 72°C durante 10 minutos.

No caso dos isolados identificados como estirpes de *Mycobacterium* amplificaram-se também os genes *hsp65* e *rpoB*, utilizando os primers “Tb11” (ACCACGATGGTGTGTCCAT) e “Tb12” (CTTGTCGAACCGCATACCCT), GrpoB1 (ATCGACCACTTCGGCAACCGCC) e “GrpoB2” (GGTACGGCGTCTCGATGAASCCG), respectivamente. Usou-se o kit “AccuPrime GC-Rich” (Invitrogen) com a seguinte mistura de reacção (25 µL): tampão de reacção B 5x, primers a 10 µM, 1U de “AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase” e 3 µL de ADN. O perfil de ciclos de temperatura envolveu a desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, annealing por 30 segundos a 60 °C, e extensão por 30 segundos a 72°C, seguido de 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

2.4 Visualização dos produtos de PCR por eletroforese de gel de agarose

Os produtos amplificados por PCR foram separados por electroforese em gel de agarose 1% (m/v) (Anexos, secção 6.3) para o gene do RNAr *16S* e 2% (m/v) para os genes *hsp65* e *rpoB*, marcados com *RedSafe*TM e visualizados num transiluminador UV a 280 nm. As bandas correspondentes aos fragmentos com o tamanho esperado foram removidas do gel por excisão e purificadas recorrendo ao kit “JETQUICK Gel Extraction Spin Kit” (Genomed). A pureza e concentração das amostras foram determinadas quantitativamente usando um NanoDrop, Modelo 2000, (ThermoScientific) e enviadas para sequenciação (Macrogen).

2.5 Teste de susceptibilidade a antibióticos

Preparou-se uma suspensão com turbidez 0.5 *McFarland* e diluiu-se 10x em tampão estéril (0,5 em 4,5 mL) de seguida, fez-se nova diluição 10x, adicionando-se 4 ml dessa suspensão a 36 ml de água ultra-pura estéril, sendo essa a suspensão de trabalho.

Distribuiu-se 200 μL da suspensão de trabalho nos poços da microplaca contendo 0.2 ml de meio líquido Mueller-Hinton previamente enriquecido com 10% de OADC, e ao qual se tinha já adicionado os antibióticos a testar segundo os gradientes de concentrações indicados na tabela 2.3). No final do ensaio, inoculou-se 100 μL da suspensão de trabalho em meio de cultura nutritivo sólido (Mueller-Hinton agar) para verificar a sua pureza. Selaram-se as microplacas com selo adesivo e incubaram-se a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Às 72 horas de incubação verificou-se o crescimento no poço do controlo positivo (turvação visível ou depósito de células no fundo do poço) e registaram-se as concentrações mínimas inibitórias de crescimento obtidas para cada antibiótico.. A leitura dos resultados foi efectuada em espectrofotómetro a um comprimento de onda de 600 nm.

Os ensaios foram feitos em triplicados e os resultados expressos como a média dos 3 ensaios, ajustada a 3 desvios-padrão, segundo o critério $3\text{-}\delta$ da lei normal. A análise e cálculo dos dados foi efectuada com o auxílio da ferramenta informática Microsoft Excell 2010, usando, como comparação as CMI definidas pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2001).

Tabela 2.3- Concentrações/diluições dos antibióticos usadas nos antibiogramas.

| Antibiótico | Concentrações/diluições usadas |
|--|---------------------------------------|
| Polimixina B | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Azlocilina | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Ácido Nólidíxico | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Trimethoprim (dissolvido em DMSO) | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Anfotericina B | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Estreptomicina | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Rifampicina (dissolvido em DMSO) | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Gentamicina | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Canamicina | 4 a 256 µg/mL – 7 diluições |
| Amicacina | 1 a 128 µg/mL - 8 diluições |
| Cefoxitina | 2 a 256 µg/mL - 8 diluições |
| Ciprofloxacina | 2 a 256 µg/mL - 8 diluições |
| Clarithromicina | 0,06 a 64 µg/mL - 11 diluições |
| Doxiciclina | 0,25 a 64 µg/mL - 8 diluições |
| Imipenemo | 1 a 128 µg/mL - 8 diluições |
| Sulfametoxazol | 1 a 128 µg/mL - 8 diluições |
| Tobramicina | 1 a 128 µg/mL - 8 diluições |
| Linezolid | 2 a 64 µg/mL - 6 diluições |

2.6 Teste de susceptibilidade das micobactérias a desinfetantes

Conforme descrito no ponto 2.5, foi determinada também a CMI para 4 desinfetantes hospitalares referidos na tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Tipos de desinfetantes fornecidos por Hospitais, utilizados no teste de resistência das micobactérias isoladas.

| Código | Tipo | Uso | Aplicação |
|---------------|---|------------|------------------|
| Nit | desinfetante com 70% etanol e 0,5% nitrito de sódio | Hospital 1 | Superfícies |
| Mãos | desinfetante comercial “Promanum” | Hospital 1 | Mãos |
| Pó | desinfetante comercial em pó (saqueta) – preparado a 4% | Hospital 1 | Equipamentos |
| HST | desinfetante com base de quaternários de amônio* | Hospital 2 | Superfícies |

*concentração desconhecida

As diluições utilizadas nos ensaios foram feitas a partir da solução fornecida pelo hospital, cuja concentração é desconhecida, sendo metade dessa concentração a concentração inicial de teste, à exceção do desinfetante “Pó”, que foi possível

preparar numa concentração superior à definida na bula do produto (1%), pelo que foi testado acima da sua concentração recomendada. Etanol comercial (96%) e lixívia (5%) foram também testados mas não fornecidos pelos hospitais.

Capítulo III

Resultados

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

3. Resultados

3.1 Análise das sequências do gene que codifica o RNAr *16S*

O ADN total dos isolados foi extraído e o gene que codifica o RNAr *16S* foi amplificado por PCR. Os produtos de PCR foram visualizados por electroforese em gel de agarose e depois de purificados foram sequenciados (serviço de sequenciação - MacroGen). A qualidade das sequências dos genes para o RNAr *16S* de cada isolado foram primeiro analisadas através do programa Sequence Scanner (Applied Biosystems) e a identificação dos isolados determinada por homologia das sequências obtidas com as sequências da base de dados NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

No Hospital 1 identificaram-se no total 145 estirpes bacterianas nos 3 isolamentos (figura 3.1). *Methylobacterium* foi o género com maior representatividade numérica no primeiro isolamento, tendo sido identificadas 27 estirpes, seguido do género *Sphingomonas* com 22 estirpes. No segundo isolamento, verificou-se que o género *Micrococcus*, foi o que apresentou um maior número de estirpes isoladas, num total de 10 estirpes. No terceiro isolamento as estirpes isoladas foram identificadas como pertencentes a 15 géneros diferentes dos quais *Methylobacterium* foi o género com maior número de estirpes identificadas.

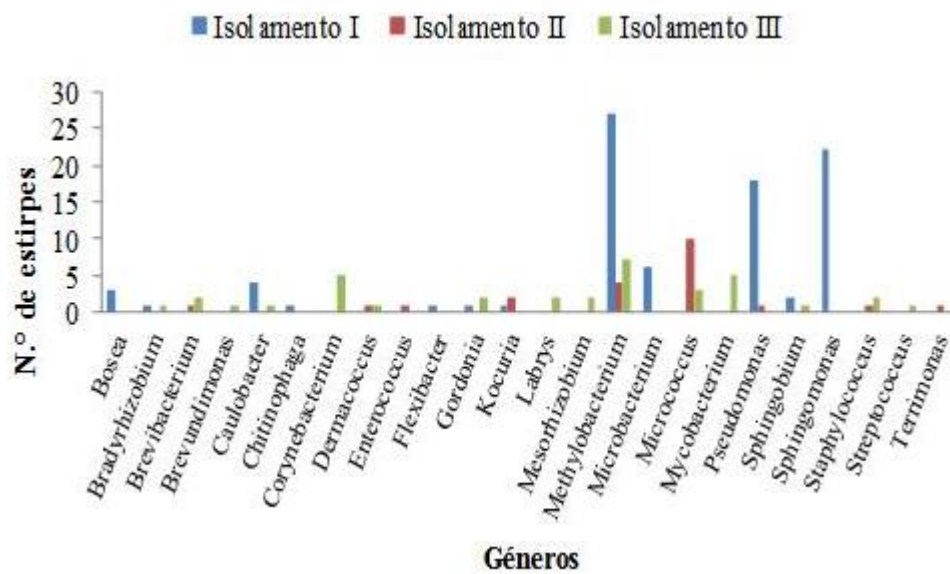


Figura 3.1 – Identificação dos gêneros presentes nas amostras dos três isolamentos efectuados no Hospital 1, com base na homologia das sequências do gene do RNAr *16S* das estirpes isoladas.

No Hospital 2 isolaram-se, no total 41 estirpes bacterianas, 21 estirpes no primeiro isolamento, 8 estirpes no segundo e 12 estirpes no terceiro (figura 3.2). Nos três isolamentos efectuados no Hospital 2, o género com maior representatividade numérica foi *Methylobacterium* com 7 estirpes no primeiro isolamento, 2 estirpes no segundo e 4 no terceiro isolamento.

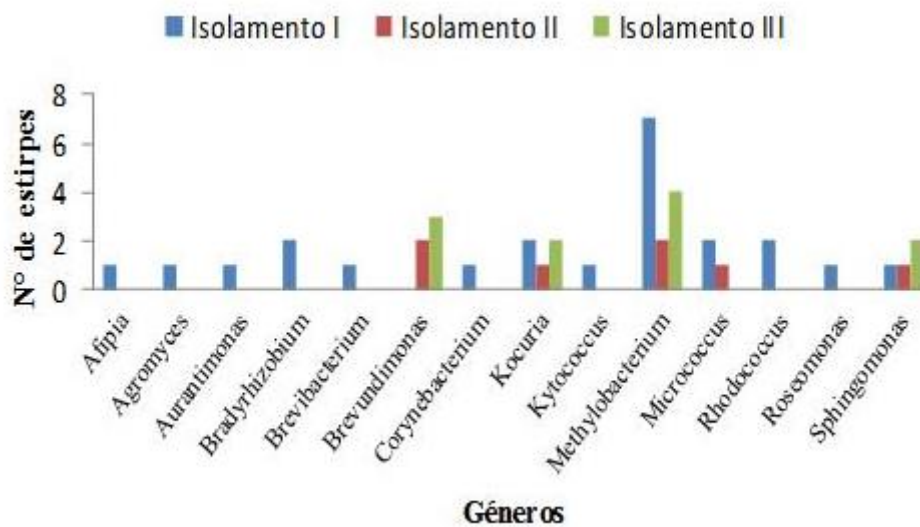


Figura 3.2 - Identificação dos gêneros presentes nas amostras dos três isolamentos efectuados no Hospital 2, com base na homologia das sequências do gene DNAr *16S* das estirpes isoladas.

Os resultados de identificação das estirpes isoladas nos dois Hospitais permitiram fazer também uma análise quanto ao número e quais as classes de bactérias presentes nas amostras. Assim, nas amostras do Hospital 1 as estirpes isoladas distribuem-se por cinco classes, Alfaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli, Gamma Proteobacteria e Sphingobacteria, enquanto que as estirpes isoladas do Hospital 2, são apenas representativas das classes Alfaproteobacteria e Actinobacteria (gráfico 3.3).

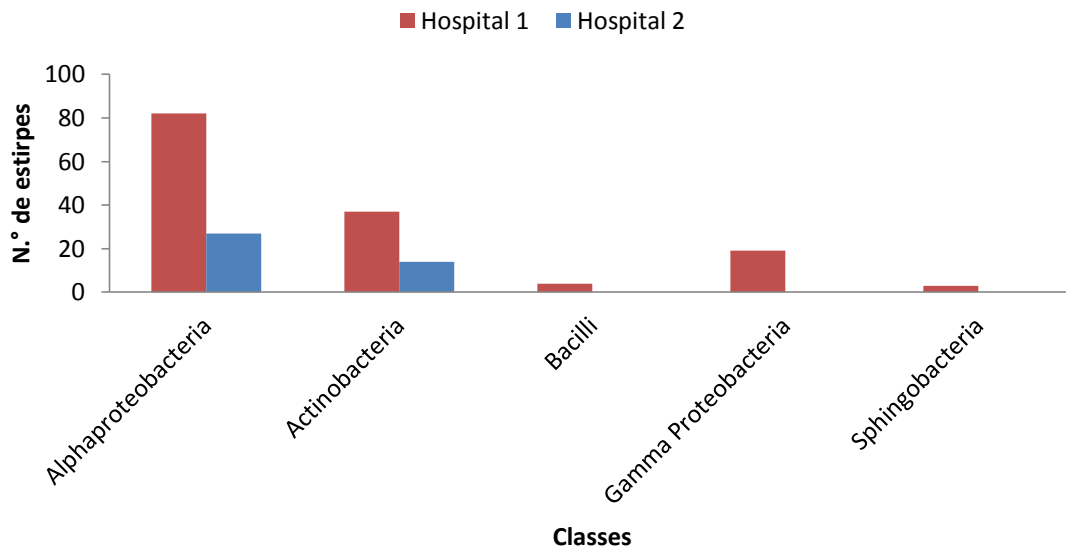


Figura 3.3 – Identificação das Classes de bactérias presentes nas amostras recolhidas dos dois hospitais.

A classe Alfabroteobactéria foi a classe com maior representação numérica em ambos os hospitais: 82 estirpes no Hospital 1 e 27 estirpes no Hospital 2, o que corresponde a 65.9% e 56.6% do total das estirpes isoladas.

No total das estirpes isoladas em ambos os hospitais, cinco foram identificadas como pertencentes ao género *Mycobacterium*. Estas cinco estirpes foram isoladas no Hospital 1 nas amostras correspondentes ao terceiro isolamento. Alguns aspetos da morfologia destas estirpes e especificamente do local onde foram isoladas estão indicados na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Cinco estirpes pertencentes ao género *Mycobacterium* que foram isoladas nas amostras do Hospital 1 (3º isolamento).

| Nome da amostra | Serviço | Local de isolamento | Morfologia das colónias | | Identificação * |
|-----------------|-------------|-------------------------------|-------------------------|---------|-----------------------|
| | | | Aspeto | Cor | |
| 10AIII | Hematologia | Bancada sala de terapêutica | Lisa | Amarela | <i>M. gordonae</i> |
| 22DIII | Urologia | Ralo lavatório wc sala grande | Lisa | Laranja | <i>M. obuense</i> |
| 24AIII | Urologia | Interruptor wc sala grande | Lisa | Branca | <i>M. mucogenicum</i> |
| 29AIII | TX Renais | Bancada sala de terapêutica | Lisa | Amarela | <i>M. gordonae</i> |
| 35AIII | TX Renais | Cama | Lisa | Amarela | <i>M. gordonae</i> |

* Identificação das estirpes com base na homologia das sequências do gene do RNAr *16S*

Na tabela 3.2 a sequência final de cada gene resulta de um alinhamento feito no programa “BioEdit v1.7”. Os isolados identificadas como “*M. gordonae*” (10AIII, 29AIII, 35AIII) apresentam uma homologia de 100% para o gene do RNAr *16S* comparando com as sequências da base de dados, no caso do gene *rpoB* a homologia das sequencias é apenas de 95% o que poderá indicar tratarem-se de estirpes diferentes, no entanto no caso dos isolados 10AIII e 35AIII faltou a determinação da sequência do gene *hsp65* (tabela 3.2). No caso dos isolados 22DIII e 24AIII, sequencias obtidas para os 3 genes quando comparadas com as sequências da base de dados apresentaram uma homologia entre 99-100% o que poderá indicar tratar-se da mesma estirpe.

3.2 Antibiogramas

Com as micobactérias identificadas, procedeu-se à elaboração do perfil de resistências a antibióticos e desinfetantes através da determinação das CMIs.

3.2.1 Testes de susceptibilidade das micobactérias a Antibióticos

A Tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos na determinação das CMIs para os antibióticos testados, *M. obuense* e *M. mucogenicum* apresentaram CMIs de 8 e 32 mg/L em relação à ciprofloxacina e à tobramicina respectivamente, correspondentes a um perfil de resistência, segundo o definido pelo CLSI (2003). Relativamente à doxiciclina, *M. mucogenicum* foi a estirpe que apresentou o perfil de resistência com CMI de 64 mg/L. As duas estirpes supracitadas também apresentaram resistência ao imipenemo (CMI= 32 mg/L) e sulfametoxazol (CMI> 128 mg/L).

O isolado 10AIII, identificado como *M. gordonae*, apresentou resistência ao imipenemo com CMI de 16 mg/L e para o sulfametoxazol (CMI> 128 mg/L). O isolado 29AIII, também identificado como *M. gordonae*, apresentou uma MIC de 8 mg/L em relação ao imipenemo, correspondente a um perfil de resistência (CLSI, 2003).

Tabela 3.3 - Concentrações inibitórias de crescimento (CMI) (mg/L) das cinco micobactérias isoladas do Hospital 1, relativamente a antibióticos abrangidos pelas normas CLSI (2003).

| Antibióticos MICs (mg/L) | 10AIII | 22DIII | 24AIII | 29AIII | 35AIII |
|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| Cefoxitina | 8 | 32 b) | 16 | 8 | 4 |
| Amicacina | >2 | 8 | >2 | >2 | >2 |
| Linezolida | 8 b) | 4 | 4 | 4 | 2 |
| Sulfametoxazol | 128 a) | 16 | >128 a) | 32 | 8 |
| Imipenem | 16 a) | 32 a) | 2 | 4 | 8 b) |
| Claritromicina | 2 | 4 b) | 1 | 8 a) | 0.125 |
| Doxiciclina | 2 b) | 1 | >64 a) | 2 b) | 1 |
| Tobramicina | 4 | 32 a) | 16 a) | 4 | 4 |
| Ciprofloxacina | 0.25 | 8 a) | 4 a) | <0.125 | <0.125 |

a) resistência; b) susceptibilidade intermédia.

Relativamente aos antibióticos não mencionados nas normas CLSI (2003), verificou-se que, em geral, as cinco micobactérias estudadas apresentaram CMI elevadas para os compostos ácido nalidíxico, polimixina B, trimethopim, azlocilina e anfotericina B. Estes antibióticos, quando comparando com as CMI dos antibióticos abrangidos pelas normas CLSI (2003), necessitam de ser administrados às micobactérias a concentrações muito elevadas para que possam inibir o seu crescimento, o que sugere uma eventual resistência das mico estudadas face a estes compostos. Gentamicina e canamicina apresentaram CMI mais baixos (<1 mg/L), o que sugere uma maior susceptibilidade das mico estudadas a estes agentes.

Tabela 3.4 - Concentrações inibitórias de crescimento (CMIs) (mg/L) de antibióticos não abrangidos pelas normas CLSI (2003) de cinco micobactérias isoladas do Hospital 1.

| Antibióticos MICs (mg/L) | 10AIII | 22DIII | 24AIII | 29AIII | 35AIII |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Neomicina | <2 | <2 | <2 | 8 | <2 |
| Espectinomicina | 32 | 16 | 64 | 64 | 32 |
| Ampicilina | 256 | >256 | 64 | 256 | 256 |
| Ácido Nalidíxico | 128 | 64 | 64 | >2048 | 64 |
| Polimixina B (a) | 5120 | 320 | 5120 | 5120 | 5120 |
| Trimethopim | 256 | 32 | 16 | 256 | 64 |
| Azlocilina | 32 | 64 | 64 | 16 | 64 |
| Gentamicina | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Canamicina | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Estreptomicina | 2 | 8 | 4 | 2 | <1 |
| Cloranfenicol | 256 | 16 | 8 | 32 | 8 |
| Rifampicina | <1 | <1 | 8 | <1 | <1 |
| Anfotericina B (b) | 64 | 256 | >512 | 256 | 64 |

(a) – concentrações em U/L; (b) – antifúngico

3.2.2 Testes de susceptibilidade das micobactérias a desinfetantes

Relativamente aos desinfetantes testados, o desinfetante Pó foi aquele que se revelou mais eficaz para inibir o crescimento das micobactérias em estudo (menor CMI). Diluições de 1:16 relativamente à concentração normal de utilização, foram eficazes para as estirpes 10AIII, 22DIII, 24AIII e 35AIII e a diluição de 1:32 foi eficaz para a estirpe 29AIII. Quanto aos restantes desinfetantes hospitalares (Nit e Mãos), verificou-se CMIs superiores aquelas observadas para o desinfetante Pó, de cerca de 1:8 a 1:2 da concentração normal de utilização.

Tabela 3.5 - Diluições mínimas inibitórias de crescimento dos desinfetantes, referentes às cinco micobactérias isoladas do Hospital 1.

| Estirpes\Desinfetantes | Etanol | Lixívia | HST | Nit | Mãos | Pó |
|------------------------------|--------|---------|------|-----|------|------|
| <i>M. gordonae</i> 10AIII | 1:8 | 1:64 | n.d. | 1:4 | 1:4 | 1:16 |
| <i>M. obuense</i> 22DIII | 1:2 | 1:16 | n.d. | 1:8 | 1:8 | 1:16 |
| <i>M. mucogenicum</i> 24AIII | 1:2 | 1:16 | n.d. | 1:8 | 1:8 | 1:16 |
| <i>M. gordonae</i> 29AIII | 1:4 | 1:64 | n.d. | 1:4 | 1:4 | 1:32 |
| <i>M. gordonae</i> 35AIII | 1:4 | 1:128 | n.d. | 1:2 | 1:4 | 1:16 |

n.d. – não determinado

Dos desinfetantes testados não fornecidos pelo hospital, o mais eficaz foi a Lixívia com CMIs de 1:16 da concentração normal de utilização para as espécies 22DIII e 24DIII, diluições inibitórias de 1:64 para as estirpes “*M. gordonae*” 10AIII e 29AIII e diluição inibitória de 1:128 para a estirpe “*M. gordonae*” 35AIII.

Capítulo IV

Discussão de Resultados

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais susceptíveis a mudanças.”

Charles Darwin

4. Discussão de Resultados

As infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT) ocorrem maioritariamente em indivíduos imunodeprimidos em ambientes hospitalares onde se revelam persistentes e são causa de morbilidade e mortalidade elevadas (Brown-Elliot & Wallace, 2007; Esteban & Ortiz-Perez, 2009; Alharbi & Zayed, 2011; Abreu, *et al.*, 2014). Esta persistência está em parte associada à protecção conferida por uma parede celular complexa rica em lípidos que lhes confere uma elevada hidrofobicidade logo impermeabilidade que explica parcialmente a resistência a muitos dos antibióticos mais frequentes (Takayama *et al.*, 2005; Hett e Rubin, 2008; Oduwole, 2008; Stanford & Stanford, 2012; Lopez-Marin, 2012).

O meio de cultura utilizado para o isolamento de MNT de ambiente hospitalar foi suplementado com cinco antibióticos que inibem a proliferação de microrganismos de crescimento mais rápido que possam estar presentes na amostra e permitem simultaneamente o crescimento seletivo de MNT que são naturalmente resistentes a esses antibióticos. No entanto, mesmo com esta pressão seletiva no meio de isolamento, foi possível recuperar cerca de 181 estirpes de bactérias de grupos taxonómicos distintos e filogeneticamente distantes do género *Mycobacterium*, o que foi mais do que o esperado considerando a força seletiva aplicada e o ambiente donde foram recolhidas as amostras. Este facto revela que as estirpes recuperadas são no mínimo resistentes a estes antibióticos, podendo ainda revelar perfis de multirresistência acrescidos.

As espécies isoladas foram identificadas através da amplificação do gene *16S* (Devulder *et al.* 2005), e verificou-se que a classe mais representativa nas amostras isoladas dos dois hospitais foi Alfabroteobacteria, o que se pode dever ao facto de ser um dos grupos bacterianos com o maior número de espécies descritas (<http://www.bacterio.net/alphaproteobacteria.html>). A classe Actinobacteria, à qual pertencem as micobactérias a que este estudo se propunha a isolar revelou ser a segunda classe com maior representatividade nas condições testadas.

Algumas estirpes do género *Mycobacterium* foram já detectadas em ambiente hospitalar designadamente das espécies. As estirpes pertencentes às espécies *M. obuense* (Buijtels *et al.*, 2009), *M. mucogenicum* (Adenkambi *et al.*, 2006; Livni *et al.*, 2008) e *M. gordonae* (Galassi *et al.*, 2003; Tobin-D'Angelo *et al.*, 2004; Fernandez-Rendon *et al.*, 2012;) que isolámos dos dois hospitais estudados foram já identificadas em ambiente hospitalar. Membros de outras espécies de *Mycobacterium*, incluindo *M. marinum* foram já por diversas vezes detectadas em ambiente hospitalar sendo frequentemente causa de infecções nosocomiais mas a nossa estratégia de amostragem e condições de isolamento não permitiram a recuperação de estirpes desta espécie dos hospitais estudados (Ryan & Ray, 2004; Seymourtier *et al.*, 2004; Ucko & Colorni, 2005). *Mycobacterium obuense* é uma espécie com muito poucos isolados documentados e foi surpreendentemente recuperada de uma amostra obtida de um dos hospitais estudados (Buijtels *et al.*, 2009; Tsukamura & Mizuno, 1971).

Dentro do género *Mycobacterium*, a similaridade genética interespecífica no processo de identificação é bastante elevada (94 – 100%), podendo haver dificuldades na sua identificação (Devulder *et al.* 2005). Como tal, foi necessário, segundo recomendado em Stackebrandt e colegas (2002) proceder a uma abordagem multigénica para amplificação de outros genes (*hsp65* e *rpoB*) para diminuir a similaridade entre as espécies. Este processo permitiu confirmar com elevado grau de certeza o resultado presuntivo obtido por sequenciação do gene *16S*. Assim, as estirpes *M. mucogenicum* 24AIII e *M. gordonae* 29AIII foram identificadas com elevada confiança. Quanto às outras três espécies, estas revelaram elevada confiança na identificação para os genes *16S* e *rpoB*. As sequências *hsp65* de *M. gordonae* 10AIII, *M. obuense* 22DIII e *M. gordonae* 35AIII, tinham má qualidade talvez devido a possíveis erros no processo de extração ou de purificação de DNA, o que dificultou a obtenção de boas sequências.

As condições húmidas favorecem um ambiente propício ao desenvolvimento das bactérias em geral. As MNT em particular não são exceção e conseguem estabelecer-se e proliferar mais facilmente, em ambientes húmidos naturais e artificiais, incluindo locais com água corrente ou estática, água potável tratada e aerossóis (Marinho, 2008;

Baird *et al.*, 2011; Briancesco *et al.*, 2014). Duas das estirpes isoladas e identificadas como pertencentes às espécies *M. obuense* 22DIII e *M. mucogenicum* 24AIII, foram isoladas de casas de banho (WC) dos hospitais, locais estes que têm bastante afluência de pacientes/funcionários, e que são mais húmidos que os restantes ambientes donde foram recolhidas amostras, o que poderá permitir a sua sobrevivência e promover a sua persistência. O facto destas estirpes terem sido isoladas no mês de Janeiro [mês com maior pluviosidade e conseqüente humidade ambiental (<http://www.ipma.pt>)] poderá também contribuir para uma possível justificação da sua recuperação no terceiro isolamento do Hospital 1.

Os resultados obtidos dos testes de resistência revelaram que a tobramicina, a ciprofloxacina, o imipenemo e o sulfametoxazol foram os menos eficazes na inibição do crescimento das micobactérias testadas, o que poderá ser consequência de mecanismos de resistência disponíveis nas estirpes estudadas. No caso da tobramicina, o decréscimo do fluxo das bombas de extrusão associadas à membranas celular, ou a alteração do local de ligação do antibiótico podem ter um papel importante na diminuição da actividade antibacteriana (Neu & Gootz, 1996). É possível que existam mecanismos eficientes como estes nas micobactérias estudadas. A ciprofloxacina é um antibiótico com ação intracelular e tem que obrigatoriamente alcançar o citoplasma para poder atuar nos seus alvos conhecidos, as enzimas ADN girase e topoisomerase IV, indispensáveis ao mecanismo de replicação de ADN. No entanto podem existir alterações ao nível da membrana externa das micobactérias estudadas que resultem num decréscimo do “uptake” e aumento da resistência a esta classe de antibióticos como verificado. Esta resistência pode também ser consequência de mutações que podem ter ocorrido em regiões específicas nos genes estruturais que fazem com que o antibiótico não se ligue eficazmente às enzimas referidas (Dzidic *et al.*, 2007; Fluit *et al.*, 2001). Quanto ao Imipenemo (β -lactâmico) a resistência observada poderá dever-se a alterações nas proteínas de ligação que levam à diminuição da sua afinidade ao antibiótico ao local de acção. Um exemplo deste mecanismo são as amidases hidrolíticas ou β -lactamases, que quebram o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas (Fluit *et al.*, 2001). No caso da resistência ao Sulfametoxazole, que foi um dos primeiros antibióticos utilizados em doenças infecciosas, o seu sobreuso terá ao

longo do tempo resultado no desenvolvimento de estirpes resistentes. Este antibiótico inibe a síntese de ácido para-aminobenzóico (PABA), fazendo com que este não seja utilizado pelas bactérias na síntese de ácido fólico, um composto essencial à síntese de ácidos nucleicos por exemplo. Como tal, os microrganismos resistentes tornaram-se capazes de utilizar folato pré-formado dispensando a síntese de novo do ácido fólico (Brody, Lerner, & Minneman, 1998; Goodman e Gilman's, 2008; Katzung, 2007; Neu e Gootz, 1996). Quanto ao efeito da doxiciclina duas estirpes de *Mycobacterium gordonae* (10AIII e 29AIII) apresentam, segundo CLSI, perfis susceptíveis à acção do antibiótico, pois $IMC \leq 1$.

Nos antibióticos não mencionados nas normas CLSI (tabela 3.3), podemos verificar que os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (inibem a síntese proteica) Kanamicina, Gentamicina, Neomicina e Amicacina são os antibióticos que mais eficazmente inibem o crescimento das cinco estirpes de micobactérias isoladas dos hospitais neste estudo, pois apresentaram concentrações inibitórias de crescimento significativamente baixas.

A ampicilina, a anfotericina B e o ácido nalidixico, foram os agentes com menor eficácia, apresentando concentrações muito elevadas de inibição para *M. gordonae* 29AIII. Anfotericina B possui uma capacidade negligenciável de inibição do crescimento de *M. mucogenicum* 24AIII, o que pode ser explicado pela sua acção antifúngica e não antibacteriana.

Os desinfetantes foram eficazes contra as cinco estirpes de micobactérias testadas pois apresentaram diluições inibitórias abaixo da concentração de trabalho utilizada nos Hospitais (tabela 3.4), pelo que todos os desinfetantes testados se revelaram micobactericidas eficazes a concentrações inferiores às de uso. Alguns tipos de desinfetantes atuam em diversos alvos da bactéria podendo atuar ao nível da membrana celular danificando-a e comprometendo a fosforilação oxidativa e inibição de transporte activo membranar (Araújo *et al.*, 2011). A perda da integridade da membrana

resulta na libertação de constituintes intracelulares essenciais como catiões de potássio, fosfato inorgânico, proteínas entre outros.

A lixívia foi a substância mais eficaz entre todos os desinfetantes testados pois apresenta as menores diluições inibitórias de crescimento das cinco estirpes de micobactérias. Este desinfetante é composto principalmente por hipoclorito de sódio que reage rapidamente com as células desnaturando os seus componentes irreversivelmente (Jakob *et al.*, 2008).

Diferentes grupos de bactérias variam na sua susceptibilidade a desinfetantes, sendo os esporos bacterianos as estruturas bacterianas mais resistentes seguidos pelas micobactérias (Russel, 1999).

4.1 Considerações finais

Em ambiente hospitalar e para além dos instrumentos de tratamento e cirúrgicos, também o mobiliário e qualquer superfície ou ponto de água que funciona como reservatório de MNT, podem ser focos de contaminação (WHO, 2002; Falkinham, 2008; Araújo *et al.*, 2011). Preocupantemente, as infecções adquiridas nos hospitais ou infecções nosocomiais, permanecem como uma causa elevada de morbidade e mortalidade (Eggimann & Pittet, 2001; Ylipalosaari *et al.*, 2006; Ponce-de-Leon, 1991; Wenzel, 1995; Wenzel, 2001; Grundmann *et al.*, 2006; WHO, 2012; Abreu *et al.*, 2014). Este estudo revelou-se bastante interessante e importante, do ponto de vista de que conseguimos isolar e identificar um elevado número de estirpes de bactérias superior ao esperado e de diferentes grupos taxonómicos. Uma vez que o isolamento foi feito em meio de cultura suplementado com um conjunto de 5 antibióticos, a conclusão principal deste trabalho é que a prevalência de bactérias multirresistentes é preocupante. Apesar do conhecimento sobre o impacto das NTM em infecções nosocomiais ainda ser pouco expressivo, com este estudo pôde confirmar-se mais uma vez a sua presença em ambiente hospitalar e em formas multirresistentes, representando um risco de saúde acrescido.

Um aspecto positivo que resulta dos resultados obtidos com os desinfectantes testados, embora numa fase ainda muito preliminar e a necessitar de confirmações adicionais, foi a susceptibilidade das 5 estirpes de MNT aos desinfectantes testados. Embora não possamos prever a ação eficaz universal destes desinfectantes contra outras estirpes de micobactérias, será aconselhável a utilização exaustiva e frequente de agentes de desinfeção como os que aqui foram testados, e concretamente no que diz respeito ao controlo de micobactérias em ambientes hospitalares. Não podemos no entanto estender, extrapolar nem prever a ação destes desinfectantes em outros grupos de bactérias nomeadamente as que foram isoladas no decorrer deste trabalho.

Em suma, toda esta problemática requer mais estudos dos mecanismos de resistência e da sua disseminação na natureza e em ambientes artificiais como o que foi aqui analisado, e o desenvolvimento de novos antibióticos com novos alvos, mais eficazes no combate às estirpes multirresistentes que ao longo dos anos têm aumentado.

Capítulo V

Referências Bibliográficas

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é.”

Albert Einstein

Referências Bibliográficas

- Abreu, P., Farias, P., Paiva, G., Almeida, A., Morais, P. (2014). Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard, *BMC Microbiology* 14(1): 118.
- Adékambi, T., Foucault, C., La Scola, B., Drancourt, M. (2006) Report of Two Fatal Cases of *Mycobacterium mucogenicum* Central Nervous System Infection in Immunocompetent Patients, *Journal of CLinical Microbiology*, 44(3): 837-840.
- Alharbi, S.A., Zayed, M.E. (2011). Antibacterial susceptibility of bacteria isolated from burns and wounds of cancer patients, *Journal of Saudi Chemical Society* 18, 3-11.
- Baird, S.F., Taori, S.K., Daveb, J., Willocks, L.J., Roddie, H., Hanson, M. (2011). Cluster of non-tuberculous mycobacteraemia associated with water supply in a haemato-oncology unit. *Journal of Hospital Infection* 79: 339-343.
- Briancesco, R., Meloni, P., Semproni, M., Bonadonna, L. (2014). Non-tuberculous mycobacteria, amoebae and bacterial indicators in swimming pool and spa *Microchemical Journal* 113: 48–52.
- Brody, Larner e Minneman. (1998). *Human Pharmacology*. (3ª ed.) Missouri: Mosby.
- CCI (2007). Incidência da Infecção Hospitalar nas Unidades de Medicina no ano de 2006. *HGSA 2007*;14:5-14.
- CCI (2004). *Manual da Comissão de Controlo da Infecção*. Porto: Hospital Geral de Santo António.
- CLSI - NCCLS. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard*. NCCLS document M24-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(3): 417-433
- Chopra, I., Schofield, C., Everett, M., O'Neill, A., Miller, K., Wilcox, M., Frère, J., Dawson, M., Czaplowski, L., Urleb, U., Courvalin, P., Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement, *Lancet Infection Disease* 8 (2008), 133-139
- Reyes-Ruvalcaba, D., *et al.* (2008). Human phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria *Immunology Letters* 116: 72–78.
- David, S., Duarte, E.L., Leite, C.Q.F., Ribeiro, J., Maio, J., Paixão, E., Portugal, C., Sancho Sousa, J.G., Implication of the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal, *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012), 1362-1367.
- Devallois, A., Goh, K.S., Rastogi, N., Rapid Identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene and Proposition of an Algorithm To Differentiate 34 Mycobacterial Species, *Journal of Clinical Microbiology* (1997) 2969–2973.
- Dzidic, S., Suskovic, J., Kos, B., (2008). Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*. 46(11), 11-21.

Referências Bibliográficas

- Santos, R., Oliveira, F., Fernandes, J., Goncalves, S., Macieira, F., Cadete, M. (2005). Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water Sci Technol* 14: 177–180.
- Escobar-Escamilla, N., Ramírez-González, J.E., González-Villa, M., Torres-Mazadiego, P., Mandujano-Martínez, A., Barrón-Rivera, C., Bäcker, C.E., Fragoso-Fonseca, D.E., Olivera-Díaz, H., Alcántara-Pérez, P., Hernández-Solís, A., Cícero-Sabido, R., Cortés-Ortíz, I.A., hsp65 Phylogenetic Assay for Molecular Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Isolated in Mexico *Archives of Medical Research* 45 (2014) 90-97.
- Eggimann, P., Pittet, D. (2001). Infection control in the ICU. *Chest* 120: 2059-93.
- Esteban, J., Martín-de-Hijas, N.Z., Ortiz, A., Kinnari, T.J., Sánchez, A.B., Gadea, I., Fernández-Roblas, R., Detection of lfrA and tap efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria, *International Journal of Antimicrobial Agents* 34 (2009) 454–456.
- Fluit, A., Visser, M., Schmitz, F. (2001). Molecular detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 837-862.
- Gemma, A., Astola, O., Rodríguez-Güell, E., Julián, E., Luquin, M., Surface Spreading Motility Shown by a Group of Phylogenetically Related, Rapidly Growing Pigmented Mycobacteria Suggests that Motility Is a Common Property of Mycobacterial Species but Is Restricted to Smooth Colonies, *Journal of Bacteriology* (2008), 190: 6894-6902.
- Goodman & Gilman's. (2008). *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Nova Iorque: McGraw Hill.
- Ingen, J., Laanb, T., Dekhuijzena, R., Boeree, M., Soolingen, D., In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous Mycobacterium isolates of 49 species in The Netherlands, *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2010) 169–173.
- Inweregbu, K., Dave, J., Pittard, A., Nosocomial infections, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 5(1) (2005), 14-17.
- Katzung, B. (2007). *Farmacologia Básica e Clínica* (10ª ed.). Brasil: McGraw Hill.
- Kendall, B.A., Varley, C.D., Choi, D., Cassidy, M., Hedber, K., Ware, M.A., Winthrop, K., Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease, *Emerging Infectious Diseases journal* 17(3) (2011).
- Kim, K., Waterer, G., Thomson, R., Yang, I.A., Nashi, N., Tan, D.B., Price, P., Levels of anti-cytokine antibodies may be elevated in patients with pulmonary disease associated with non-tuberculous mycobacteria, *Cytokine* 66(2) (2014) 160–163.
- WHO (2011). “Acudir al hospital, más peligroso que viajar en avión”. *Comunicação de Liam Donaldson ao jornal El Mundo*, Julho 2011. <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2011/07/21/noticias/1311271822.html>
- Lopes, J.S., *et al.* (2013). SNP typing reveals similarity in Mycobacterium tuberculosis genetic diversity between Portugal and Northeast Brasil, *Infection, Genetics and Evolution* 18: 238-246.
- Marinho, A. G Fernandes, G., Carvalho, T., Pinheiro, D., Gomes, I. (2008). Nontuberculous mycobacteria in non-AIDS patients, *Revista portuguesa de pneumologia* 14(3): 323-337.

Referências Bibliográficas

- Monteiro J.A. (1993). Infecções Nosocomiais. Alguns Aspectos. *Acta Médica Portuguesa* 6: 135-140.
- Neu, H., Gootz, T. (1996). Antimicrobial Chemotherapy. Em Baron S (Eds.), *Medical Microbiology*, (4ª ed., Cap. 11). Galveston.
- Ortiz-Perez, A., Martín-de-Hijas, N., Alonso-Rodríguez, N., Molina-Manso, D., Fernández-Roblas, R., Esteban, J. (2011). Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(2): 79-84.
- Rice, L., Bonomo, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. em Violor Lorian, M. D. (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine* (5ª ed., pp. 441-476). Nova Iorque.
- Roberts, S., Lowe, O., Pandey, S., Williamson, D.A., Newton, S., Vaughan, R. (2012). Comparison of the MGIT TBc immunochromatographic assay with the Accuprobe Gen-Probe TB assay for identification of Mycobacterium tuberculosis complex: results from a low-burden tuberculosis setting, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 74: 415-416.
- Ryan, K., & Ray, G. (2004). The bacterial cell. em McGraw-Hill (Eds.), Sherris - *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases* (4ª ed., pp. 9 - 75), Nova Iorque.
- Stanford, J., Stanford, C. (2012). Mycobacteria and their world, *International Journal of Mycobacteriology* 1 3-12.
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P. (2013). The role of natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, *Lancet Infectious Disease* 13: 155-165.
- WHO, Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. 2nd edition World Health Organization, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response (2002). <http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>
- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO; 23 (2013).
- Ylipalosaari P *et al.* (2006). Intensive care acquired infection is an independent risk factor for hospital mortality: a prospective cohort study. *Critical Care*; 10:R66.
- Ponce-de-Leon, S. (1991). The needs of developing countries and the resources required. *J Hosp Infect* 18 (Supplement): 376-381.
- Wenzel, R. (1995). The economics of nosocomial infections. *J Hosp Infect* 1995; 31:79-87.
- Wenze,l R. (2001) The impact of Hospital-Acquired bloodstream Infection. *Emerging Infectious Diseases*; 7(2): 285-288.
- Grundmann, H. *et al.* (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant Shaphylococcus aureus as a public-health treat. *Lancet* 368(9538): 874-85.
- Pittet, D, Wenzel, R. (1995). Nosocomial bloodstream infection. Secular trends in rates, mortality and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 155: 1177-1184.
- Fortes, P., Ruiz, T. (2004). Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Revi Saúde Pública* 38(3): 372-8.

Referências Bibliográficas

- Rocha, A. (2002). Vigilancia de la infección nosocomial en la UCI. *Med Intensiva* 26(2): 61-3.
- Pittet, D, Taraara, D, Wenzel, R. (1994). Nosocomial bloodstream infections in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 271: 1598–1601.
- Kirkland, K. *et al.* (1999). The impact of surgical-site infections in the 1990's: attributable mortality, excess length of hospitalization and extra costs. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 20: 725–730.
- Pina, E., Paiva, J., Nogueira, P., Silva, M. (2013). OMS Prevalência de Infecção Adquirida no Hospital e do uso de Antimicrobianos nos Hospitais Portugueses – inquérito 2012.
- Ducel, G., *et al.* (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales – Guía práctica. OMS, 2003.
- Emori, T., Gaynes, R. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6: 428-42.
- Burke, P. (2003). Infection Control – A problem for patient safety. *N Engl J Med* 348(7): 651-6.
- PNCI (2003). Critérios do CDC para diagnóstico de infecções. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Programa Nacional de Controlo de Infecção.
- PNCI (2006). Recomendações para as Precauções de Isolamento. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Programa Nacional de Controlo de Infecção.
- Nielsen, P., Fritze, D., Priest, E. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: Proposal for nine new species. *Microbiology*, 141: 1745-1761.
- Pfyffer, G. (2007). *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 543-572). Washington D.C.: ASM Press.
- Schroder, K., Naumann, L., Kroppenstedt, R., Reischl, U. (1997). *Mycobacterium hassiacum* sp. nov., a New Rapidly Growing Thermophilic Mycobacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1): 86-91.
- Falkinham, J.III (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 107(2): 356-67.
- Yang, S., *et al.* (2014). *Mycobacterium tuberculosis* Rv1096 protein: gene cloning, protein expression, and peptidoglycan deacetylase activity. *BMC Microbiology*, 14: 174.
- Devulder. G., Pérouse de Montclos, M., Flandrois, J. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 293–302.
- Falkinham, J.III (1996). Epidemiology of Infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9: 177-215.
- Falkinham, J.III (2002). Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 23: 529-551.
- Wayne, L., Sramek, H. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev*, 5: 1-25.
- Biet, F., Boschirola, M., Thorel, M., Guilloteau, L. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Vet Res* 36: 411-436.

Referências Bibliográficas

- Brown-Elliott, B., Wallace, R. (2007). *Mycobacterium*: clinical and laboratory characteristics of rapidly growing mycobacteria, p. 589-600. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed., vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
- Esteban, J., & Ortiz-Perez, A. (2009). Current treatment of atypical mycobacteriosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(17): 2787-2799.
- Lewis, F., Marsh, B., von Reyn, C. (2003). Fish Tank Exposure and Cutaneous Infections Due to *Mycobacterium marinum*: Tuberculin Skin Testing, Treatment, and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 37(3): 390-397.
- Van Seymourtier, P., Verellen, K., De Jonge, I. (2004). *Mycobacterium Marinum* causing tenosynovitis. "Fish tank finger". *Acta Orthop. Belg.* 70: 279-282.
- Aronson JD (October 1926). "Spontaneous tuberculosis in salt water fish". *J Infect Dis* 39 (4): 314-320.
- Gunther, S., Elliott, R., Brand, R., Adams, J. (1977). Experience with atypical mycobacterial infection in the deep structures of the hand. *J Hand Surg* 2: 90-96
- Ucko, M., Colorni, A. (2005) *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. *J Clin Microbiol.* 43(2): 892-5.
- Galassi, L., Donato, R., Tortoli, E., Burrini, D., Santianni, D., Dei, R. (2003). Nontuberculous mycobacteria in hospital water systems: application of HPLC for identification of environmental mycobacteria. *J Water Health* 01: 133-139.
- Tobin-D'Angelo, M. (2004). Hospital Water as a Source of *Mycobacterium avium* Complex Isolates in Respiratory Specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 98-104.
- Fernandez-Rendon, E. *et al.*, 2012. *Mycobacterium mucogenicum* and other non-tuberculous mycobacteria in potable water of a trauma hospital: a potential source for human infection. *J Hosp Infect.* 80(1): 74-76.
- Adenkambi *et al.* (2006). Report of Two Fatal Cases of *Mycobacterium mucogenicum* Central Nervous System Infection in Immunocompetent Patients, *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 837-840.
- Livni, G., *et al.* (2008). Outbreak of *Mycobacterium mucogenicum* bacteraemia due to contaminated water supply in a paediatric haematology-oncology department. *J Hosp Infect* 70(3): 253-258.
- Tsukamura, M., Mizuno, S. (1971). "*Mycobacterium obuense*, a rapidly growing scotochromogenic *mycobacterium* capable of forming a black product from p-aminosalicylate and salicylate". *J. Gen. Microbiol.* 68 (2): 129-34.
- P.C. Buijtel, P. *et al.*, (2009). Isolation of non-tuberculous mycobacteria at three rural settings in Zambia; a pilot study *Clin Microbiol Infect* 16: 1142-1148.
- Tenover, F. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* 34(5 Suppl 1): S3-10; discussion S64-73.
- Morier, D. (2009). Antibiotic resistance: mechanisms of antibiotic resistance. em *Encyclopedia Britannica Online*. Visualizado a 15 de Junho 2014, no

Referências Bibliográficas

<http://www.britannica.com/EBchecked/media/129670/There-are-multiple-mechanismsby-which-bacteria-can-develop-resistance>

Maris, P. (1995). Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech* 14: 47–55.

Wright, G. (2003). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviewa* 57: 1451-1464.

Takayama, K., Wang, C., Besra, G. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 18(1): 81-101.

Hett, E., Rubin, E. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 72(1): 126-56.

Oduwole, E. O. (2008). Generation of a database of mass spectra patterns of selected *Mycobacterium* species using MALDI-ToF mass spectrometry (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Stanford, J., Stanford, C. (2012). “*Mycobacteria* and their world”. *International Journal of Mycobacteriology* 1(1): 3–12.

Lopez-Marin, L. M. (2012). Nonprotein structures from mycobacteria: emerging actors for tuberculosis control. *Clinical & developmental immunology*.

Capítulo VI

Anexos

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

6. Anexos

6.1 Meios de cultura para bactérias

6.1.1 Mistura de antibióticos PANTA

Tabela 6.1 – Formulação da mistura de antibióticos PANTA.

| Reagente | Quantidade por Litro | Concentração final |
|------------------|----------------------|--------------------|
| Polimixina B | 40000 U | 20% |
| Azlocilina | 4 g | 20% |
| Ácido Nalidixico | 16 g | 20% |
| Trimethoprim | 40 g | 20% |
| Anfotericina B | 4 g | 20% |

Os antibióticos pertencentes à mistura PANTA foram todos esterilizados por filtração, recorrendo-se a um sistema de filtração estéril com um filtro de 0.22 µm, e foram armazenados a -20°C.

6.1.2 Solução de enriquecimento de OADC

Tabela 6.2 – Formulação da solução de enriquecimento OADC.

| Reagente | Quantidade por Litro | Concentração Final |
|------------------------------|----------------------|--------------------|
| NaCl | 8.5 g | 0.85% |
| Albumina Bovina (Fraction V) | 50 g | 5% |
| D-dextrose | 20 g | 2% |
| Catalase | 0.04 g | 0.004% |
| Ácido Oleico | 0.5 g | 0.05% |

Após a solução de enriquecimento OADC se encontrar bem homogeneizada, foi esterilizada por filtração, recorrendo-se a um sistema de filtração estéril com um filtro de 0.22 µm, e foram armazenados a 4°C.

6.1.3 Meio de isolamento

Tabela 6.3 – Formulação do meio cultura de isolamento de bactérias.

| Reagente | Quantidade por Litro | Concentração Final |
|-----------------------|----------------------|--------------------|
| Middlebrook 7H10 agar | 20 g | 2% |
| OADC | 100 mL | 10% |
| PANTA | 5 mL | 0.5 % |

O meio foi autoclavado e arrefecido à temperatura ambiente. Posteriormente, tanto o OADC como a mistura PANTA foram adicionados ao meio antes que este

solidificasse. Este meio foi utilizado para isolar as estirpes provenientes das amostragens, a uma temperatura de 30°C.

6.2 Soluções para extração de ADN genómico

6.2.1 Tampão de lise (reagente GES)

Inicialmente, foram misturados 60 g de *tiocianato de guanidina*, 20 mL de EDTA 0.5M pH 8.0 e 20 mL de água ultra-pura, tendo a mistura sido aquecida a 65°C até ficar completamente dissolvida. Após o arrefecimento da mistura, adicionou-se 1 g de sarcosina (*N-Lauroilsarcosina*) e água ultra-pura até perfazer 100 mL. Finalmente, a mistura foi esterilizada por filtração, recorrendo-se a um sistema de filtração estéril com um filtro de 0.45 µm, e foi armazenada à temperatura ambiente.

6.3 Electroforese em gel de agarose 1 e 2%

6.3.1 Tampão TAE 50x (stock)

Tabela 6.4 – Formulação da solução TAE 50x.

| Reagente | Quantidade por litro | Concentração final |
|--|----------------------|--------------------|
| Tris base | 242 g | 2M |
| Ácido acético | 57.1 mL | 2M |
| Solução aquosa de 0.5mM EDTA pH 8.0 | 100 mL | 50mM |

Procedeu-se à dissolução de Tris na solução aquosa de EDTA em simultâneo com o aquecimento da mistura. Foi adicionado ácido acético, seguindo-se o ajuste do pH para 8 com solução de NaOH a 5M.

6.3.2 Gel de agarose 1 e 2%

Tabela 6.5 - Formulação do gel de agarose 1%.

| Reagente | Quantidade por 100 ml | Concentração final |
|---|-----------------------|--------------------|
| Agarose | 1 g | 1% |
| Tampão TAE | 100 mL | 1x |
| RedSafe TM 20000x (Intron Biotechnology) | 5 µL | 1x |

Tabela 6.6 – Formulação do gel de agarose 2%.

| Reagente | Quantidade por 100 ml | Concentração final |
|---|-----------------------|--------------------|
| Agarose | 2 g | 2% |
| Tampão TAE | 100 mL | 1x |
| RedSafe TM 20000x (Intron Biotechnology) | 5 µL | 1x |

A agarose foi dissolvida no tampão TAE 1x e esta mistura foi aquecida até ferver. A mistura foi arrefecida até deixar de libertar vapores, sendo adicionado RedSafe™ nesta fase seguindo-se agitação ligeira para homogeneizar. Verteu-se a mistura para um suporte apropriado para o gel, foram colocados os pentes e durante 30 minutos aguardou-se que o gel polimerizasse. As amostras (com *loading buffer*) e o marcador de pesos moleculares de ADN foram aplicados no gel, tendo este sido corrido em tampão TAE 1x a 95 V durante aproximadamente 35 minutos.