

## Lista de tabelas e gráficos

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Resultados da prova cromogênica de $\beta$ -lactamase	33
<b>Tabela 2:</b> Resistência à Meticilina e produção de $\beta$ -lactamase	Anexo 4
<b>Tabela 3:</b> Valor de qui-quadrado obtido pelo <i>Chi-Square tests</i>	Anexo 4
<b>Gráfico 1:</b> Perfil de sensibilidade e resistência de <i>S. aureus</i>	30
<b>Gráfico 2:</b> Frequência de <i>S. aureus</i> em função da natureza da amostra	32
<b>Gráfico 3:</b> Resistência à Meticilina e produção de $\beta$ -lactamase	34

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estruturas do PABA e Sulfonamidas	ANEXO 1
<b>Figura 2.</b> Estrutura da Ticarcilina	ANEXO 1
<b>Figura 3.</b> Estrutura de algumas Tetraciclina	ANEXO 2
<b>Figura 4.</b> Estrutura do Cloranfenicol	ANEXO 2
<b>Figura 5.</b> Observação da Hemólise	APÊNDICE A
<b>Figura 6.</b> Fermentação do Manitol	APÊNDICE B
<b>Figura 7.</b> Prova de $\beta$ -lactamase	APÊNDICE C
<b>Figura 8.</b> Padronização do inóculo	APÊNDICE D
<b>Figura 9.</b> Retirada do inóculo para semeadura na placa	APÊNDICE D1
<b>Figura 10.</b> Plaqueamento do inóculo.	APÊNDICE D2
<b>Figura 11.</b> Ilustração do plaqueamento do inóculo	APÊNDICE D3
<b>Figura 12.</b> Medição dos halos de inibição	APÊNDICE D4

**Lista de siglas e abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleíco
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleíco
<b>CNS</b>	Coagulase Negative <i>Staphylococcus</i>
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>F.</b>	Frequência
<b>GISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> glicopéptido-intermédio
<b>HCM</b>	Hospital Central de Maputo
<b>HIV</b>	Vírus de Imunodeficiência Humana
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>LCR</b>	Líquido Céfalo-Raquidiano
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Ágar
<b>ml</b>	mililitros
<b>ORSA</b>	Oxacilin Resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PABA</b>	Para-aminobenzoic acid
<b>PBPs</b>	Penicilin-Binding Proteins
<b>PBP2a</b>	Penicilin-Binding Protein 2a
<b>S.</b>	Staphylococcus
<b>SSSS</b>	Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino-resistente
<b>NTED</b>	Síndrome do Choque Tóxico Neonatal
<b>TSA</b>	Teste de sensibilidade antimicrobiana
<b>VISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina-intermédio

## **Dedicatória**

Dedico aos meus pais Ilda Samissone Panhela e Pedro Zawangone o presente trabalho, pela incessante presença, ponderação, predicação e ensinamento.

## Agradecimentos

Quero deixar ficar aqui o meu reconhecimento à Direcção do Hospital Central de Maputo, pela permissão concedida para execução do projecto.

Aos meus supervisores, Juvêncio Manuel Nota e Oraima Escandell Garcia, quero manifestar o meu profundo agradecimento pela orientação e meticulosa revisão do trabalho.

Aos meus amigos, Tomé Ramadane Ehima, José V. Caetano, Edson Tereso Mambuque, Virgílio Carménia Cossa, Arão Zunguze e Manuel, pelo apoio e motivação.

À minha namorada, Josefina José Armindo, agradeço. É pena que as palavras sejam tão áridas e não possam expressar com profundidade o meu apreço.

À minha sogra futura, Ana Elisa Mbate, quero deixar o meu enaltecido reconhecimento por todo apoio prestado incluindo a reprodução em *hard-copy* do presente trabalho.

Aos meus tios Ozias Tembe e Catarina Panhela pelo apoio no início da minha carreira académica.

Pretendo ainda agradecer a toda equipe do Laboratório de Microbiologia que tornou viável o meu trabalho. Ao Dr. Tomás F. Zimba, à Lic<sup>a</sup> Cidália, Lic<sup>a</sup> Suzana, Lic<sup>a</sup> Camélia N. Boa, Técnicos, Serventes, Administrativos, ao Sr. Alexandre, Sr. David e Atália Alberto, o meu agradecimento é endereçado.

De forma indiscriminada, agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio que me tem prestado em todos sentidos.

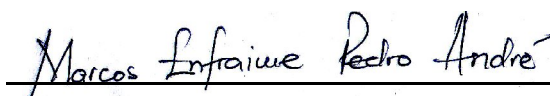
À todos membros do Laboratório de Mutagênese Ambiental (UFRN/Brasil-2009).

### **Declaração de honra**

Eu, Marcos Enfraime Pedro André, filho de Pedro Dos Santos André e de Ilda Samissone Panhela, natural de Maputo, declaro por minha honra que esta Monografia Científica é resultado da minha investigação pessoal e das orientações dos meus supervisores, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia.

Declaro ainda que, este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

Maputo, aos 07 de Setembro de 2010



(Marcos Enfraime Pedro André)

## Resumo

Esta pesquisa objectivou avaliar a prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA), isolados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo, no período que vai de Fevereiro a Maio, para tal foram analisadas 2888 amostras biológicas. As amostras foram processadas e identificadas conforme procedimento para cada espécime clínico (utilizou-se a técnica de coloração de Gram, fermentação do manitol, e testes enzimáticos de catalase e coagulase). O perfil de sensibilidade e Resistência *in vitro* foi realizado pelo método de Kirby-Bauer, onde avaliou-se o comportamento das cepas face aos seguintes antibióticos: Canamicina-K (30 µg), Ticarcilina-TI (75 µg), Amicacina-AK (30 µg), Minociclina-MI (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Trimetoprima/sulfametoxazol-SXT (25 µg), Piperacilina/tazobactam-TZP (36 µg), Meticilina-M (5 µg), Nitrofurantoína-F (100 µg) e Ticarcilina/clavulanato-TIM (75/10 µg). Baseando-se na estatística descritiva e inferencial, com recurso ao software SPSS-17 e Excel-2007, obteve-se os resultados que destacam uma prevalência elevada de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (76%, n=50) cuja origem é desconhecida. Da avaliação do perfil de sensibilidade e resistência foi verificada maior sensibilidade de *Staphylococcus aureus* face à Aminoglicosídeos (Amicacina e Canamicina), Tetraciclina (Minociclina) e Cloranfenicol e a resistência em maior grau foi observada face à antibióticos β-lactâmicos (TI, SXT, TZP e TIM). De entre as 50 cepas isoladas, 74% foram positivas ao teste de β-lactamase e a hemólise foi verificada em 70% das cepas, com predominância do tipo delta-hemólise. Do total de cepas resistentes à Meticilina (76%, n=50) verificou-se que a maioria é produtora da enzima β-lactamase, o que permitiu concluir com base no valor de qui-quadrado obtido do cruzamento das variáveis resistência à Meticilina e produção de β-lactamase que a resistência à Meticilina depende da produção da β-lactamase. Os resultados da presente pesquisa sugerem o uso de Amicacina, Canamicina, Minociclina e Cloranfenicol para o tratamento de infecções estafilocócicas.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, Prevalência, Resistência à Meticilina, Teste de sensibilidade antimicrobiana.

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O presente trabalho intitulado “Avaliação da Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes em amostras clínicas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo” enquadra-se em duas linhas de pesquisa, designadamente, Saúde Pública e Microbiologia Médica, desenvolvidas pelo Departamento de Biologia da Universidade Pedagógica e pelo Laboratório de Microbiologia do HCM.

O estudo pode ser caracterizado como sendo de natureza exploratória na medida em que escasseiam estudos desta natureza em nosso país, sendo que o único de referência, nesta área, que tenho conhecimento, é o de Chuquela (2009), embora existam estudos análogos desenvolvidos, por exemplo, no Brasil e Estados Unidos da América.

A compreensão da Biologia do *S. aureus* no contexto da Microbiologia médica reflecte-se de grande importância dada ao facto deste ser o mais importante do género *Staphylococcus*, estando envolvido em diversas patologias que vão desde intoxicações alimentares ou infecções cutâneas, até infecções hospitalares graves, principalmente da corrente sanguínea, além disso, por demonstrar uma resistência crescente aos antibióticos utilizados para o seu controlo (BROOKS *et al.*, 2000 apud LIMA, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram positivos formadores de agregados que pertencem à família Micrococcaceae. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e imóveis, que se distinguem de outras espécies de estafilococos por formar colónias amarelo-douradas em ágar e por produzirem a enzima coagulase (RIBEIRO & CASTANHEIRA, 2003; DE SOUZA, 2008).

Com o advento dos antibióticos e quimioterápicos tornou-se possível o controlo e cura de várias doenças infecciosas, dentre as quais aquelas causadas por *S. aureus*, mudando a evolução natural dessas doenças de forma marcante. No entanto, dez anos após a descoberta da penicilina e antes mesmo dela estar disponível para uso clínico, descobriu-se a existência de enzimas bacterianas envolvidas na resistência aos antibióticos derivados da penicilina.



Essa resistência aos antibióticos vem aumentando a escala mundial, configurando-se, deste modo, um sério problema na vigilância médico-sanitária. Tal resistência é explicada por alguns autores como estando relacionada ao uso abusivo e descontrolado de antibióticos, bem como a falta de definição clara dos critérios na escolha do tratamento (MELO, 2007; JUNIOR *et al.*, 2009; NETO, 2001)

Usualmente, a Meticilina e a Nafcilina são penicilinas semi-sintéticas indicadas para o tratamento da infecção por estafilococos produtores de  $\beta$ -lactamase. Actualmente 30 a 50% das estirpes de *S. aureus* são resistentes a essas penicilinas semi-sintéticas enquanto a Vancomicina é com frequência usada para os estafilococos resistentes à Oxacilina ou Meticilina (MURRAY *et al.*, 2004; CAVALIERE, 2005).

Em um estudo feito por Júnior *et al.* (2009), nos Estados Unidos, encontrou-se que mais de 90% de *S. aureus* apresentavam resistência à penicilina e em amostras analisadas em unidades de cuidado intensivo mais de 50% eram resistentes à Oxacilina.

Com relação a África e Moçambique em particular a literatura disponível correspondente ao comportamento de *S. aureus* face à Meticilina é escassa.

Na base de consideração desses factos e valorizando a necessidade de perceber melhor as variações na prevalência e resistência de *S. aureus*, foi que se definiu pela escolha do tema. Com este estudo pretende-se essencialmente determinar a prevalência de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes em amostras clínicas e conhecer o seu perfil de sensibilidade face à alguns antibióticos, perspectivando subsidiar uma política de antibióticos, a partir do conhecimento do perfil de sensibilidade antibiótica das estirpes isoladas.

### 1.1. Problema

O número de infecções adquiridas na comunidade e nasocomiais por *Staphylococcus aureus* aumentou nos últimos 20 anos. Estudos de Almeida *et al.* (2007), em hospital Brasileiro, apontam uma prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina na ordem de 16,3%. Em Moçambique um estudo recente, de Chuquela (2009), feito no berçário do HCM, teve como resultado 48,9% de resistência a Oxacilina (antibiótico da mesma classe que a Meticilina).

Verifica-se que as cepas responsáveis pelas infecções têm demonstrado crescente resistência aos antibióticos que até então eram confiados para o tratamento das infecções, em particular a Meticilina. Este deliberado estado de resistência dificulta o tratamento e ainda pelo facto da resistência a Meticilina estar sob controlo plasmidial, ela é rapidamente disseminada por processos de transdução e conjugação bacteriana.

### 1.2. Justificativa

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria que pode causar uma variedade de infecções tanto em indivíduos sãos como em imunodeficientes. Também pode colonizar a pele e as fossas nasais facilitando sua transmissão, particularmente, em ambientes hospitalares.

Comummente a Meticilina assim como a Nafcilina são os antibióticos de eleição para o tratamento de infecções estafilocócicas. A resistência de *S. aureus* à Meticilina (um  $\beta$ -lactâmico) confere também resistência a todos outros antibióticos da mesma classe, reduzindo deste modo as alternativas antibióticas para o tratamento de infecções por *S. aureus*.

Posto isto, é importante avaliar a distribuição de *S. aureus*, conhecer o seu perfil de sensibilidade e resistência antibiótica para propor medidas terapêuticas alternativas. Tomando ainda em consideração que estudos desta natureza são escassos na nossa província.

Do ponto de vista de contributo para a Educação, esta pesquisa é relevante na medida em que permite ao pesquisador (estudante) entrar em contacto directo com técnicas

laboratoriais de Microbiologia, aperfeiçoando o manuseamento do microscópio, assim como técnicas de cultura, isolamento e identificação de microrganismos, aspectos bastante relevantes para um estudante superior de Biologia que lhe permitem consolidar a teoria apreendida ao longo dos anos.

### **1.3. Objectivos da pesquisa**

#### **1.3.1. Objectivo geral**

Avaliar a prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina isolados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo no período de Fevereiro a Maio.

#### **1.3.2. Objectivos específicos**

O presente trabalho tem como objectivos específicos os seguintes:

- Determinar a prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes nas amostras processadas;
- Determinar o perfil de sensibilidade e resistência das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas;
- Identificar a natureza da amostra com maior ocorrência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente;
- Estabelecer uma relação entre a resistência de *S. aureus* à meticilina com a produção de  $\beta$ -lactamase.

### **1.4. Questões e Hipóteses**

#### **1.4.1. Questões**

1. Qual é a prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente nas amostras processadas no Laboratório de Microbiologia?
2. Em que amostras ocorre com maior frequência o *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente?

3. Que relação se pode estabelecer entre a resistência de *S. aureus* à meticilina com a produção de  $\beta$ -lactamase?

#### 1.4.2. Hipóteses

*Para a questão 1*

**H0:** A prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente nas amostras processadas no Laboratório de Microbiologia é baixa.

**H1:** A prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente nas amostras processadas no Laboratório de Microbiologia é alta.

*Para a questão 2*

**H0:** *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente é mais frequente em líquidos estéreis (sangue e LCR).

**H1:** *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente é mais frequente em líquidos não esteréis.

*Para a questão 3*

**H0:** A resistência de *S. aureus* meticilino-resistente depende da produção de  $\beta$ -lactamase.

**H1:** A resistência de *S. aureus* meticilino-resistente não depende da produção de  $\beta$ -lactamase.

## CAPÍTULO II – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Características dos estafilococos

A maioria dos estafilococos são microrganismos imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase-positivos, crescem em meio contendo 10% de cloreto de sódio, temperatura que varia de 30 a 37 °C e pH de 4,2 a 9,3 (com pH ótimo de 7,0 a 7,5). Essas bactérias estão presentes na pele e nas membranas mucosas dos seres humanos, em outros mamíferos e em aves (MURRAY *et al.*, 2004; HOLT *et al.*, 1994 apud LIMA, 2007).

As colônias de *S. aureus* são douradas em consequência dos pigmentos carotenóides que os microrganismos formam durante o crescimento, podem ser brancas, amarelas ou alaranjadas e isso era antigamente base para a classificação dos estafilococos (*albus*, *aureus* e *citreus*), em caldo não há pigmentação. É também a única espécie encontrada no ser humano que produz a enzima coagulase. Todas as outras espécies são normalmente referidas como estafilococos coagulase-negativos (MURRAY *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2006).

Nas placas de ágar-sangue de carneiro, os estafilococos produzem três hemolisinas (alfa, beta e delta); se as hemácias forem de coelho só há produção de hemólises alfa e delta; se forem humanas, haverá produção de hemólise delta evidente e alfa apenas parcial (MOURA *et al.*, 2006).

### 2.2. Patogenia e imunidade dos estafilococos

#### 2.2.1. Toxinas estafilocócicas

O *S. aureus* produz muitos factores de virulência, incluindo, pelo menos, cinco toxinas citolíticas ou produtoras de lesão da membrana (leucocidinas alfa, beta, delta, gama e Penton-Valentine [P-V]); duas enzimas esfoliativas; oito enterotoxinas (A-E, G-I) e a toxina I da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

As toxinas citolíticas foram erroneamente descritas como lisinas mas a actividade das primeiras quatro toxinas não é exclusivamente aos eritrócitos. As citotoxinas podem lisar neutrófilos, resultando na liberação de enzimas lisossomais que, subsequentemente, ocasionam danos aos tecidos circundantes (MURRAY *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Enzimas estafilocólicas

A **Coagulase** é uma enzima cujo papel é especulativo na patogenia da doença mas pode causar a formação de uma camada de fibrina ao redor do abscesso estafilocócico, localizando assim a infecção e protegendo a bactéria da fagocitose (MURRAY *et al.*, 2004).

A prova de coagulase classifica os estafilococos em *Staphylococcus aureus* (coagulase-positivos) e *Staphylococcus epidermidis* ou *Staphylococcus saprophyticus* (coagulase-negativos).

A enzima **catalase** catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio tóxico em água e oxigénio. O peróxido de hidrogénio pode se acumular durante o metabolismo bacteriano ou após a fagocitose (MURRAY *et al.*, 2004).

A enzima **hialuronidase** hidrolisa ácidos hialurônicos, os mucopolissacarídeos ácidos presentes na matriz acelular do tecido conjuntivo. Essa enzima facilita a disseminação de *S. aureus* nos tecidos. Mais de 90% das cepas de *S. aureus* produzem essa enzima (MURRAY *et al.*, 2004). Já a **fibrinolisin**a também designada estafiloquinase, é produzida por, praticamente, todas as cepas de *S. aureus* e pode dissolver coágulos de fibrina. A estafiloquinase é diferente das enzimas fibrinolíticas produzidas pelos estreptococos (MURRAY *et al.*, 2004).

Todas as cepas de *S. aureus* e mais de 30% das cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativo produzem enzimas denominadas **lipases** que hidrolisam lípidos, o que possibilita a sobrevivência dos estafilococos nas áreas sebáceas do corpo (MURRAY *et al.*, 2004).

As  **$\beta$ -lactamases** são enzimas que hidrolisam os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Como resultado a célula é resistente a acção dos medicamentos  $\beta$ -lactâmicos. Nas bactérias gram-positivas as  $\beta$ -lactamases são secretadas extracelularmente no meio circundante e destroem as moléculas  $\beta$ -lactâmicas antes que estas tenham oportunidade de entrar na célula.

A maioria de  $\beta$ -lactamases inactivam penicilinas ou cefalosporinas mas algumas são capazes de inactivar ambos tipos de antibióticos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005; BONOMO & TOLMASKY, 2007).

O gene da  $\beta$ -lactamase que medeia a resistência do *Staphylococcus aureus* à penicilina está tipicamente albergado em um plasmídeo (CAVALIERE *et al.*, 2005).

### 2.3. Cultura de estafilococos

As amostras devem ser inoculadas em meio de ágar nutricionalmente enriquecido e suplementado com sangue de carneiro. Se houver mistura de microrganismos na amostra (amostras de fermento, por exemplo), o *S. aureus* pode ser isolado selectivamente no meio de ágar suplementado com 7,5% de cloreto de sódio, o que inibe o crescimento da maioria dos outros microrganismos, e Manitol, que é fermentado pelo *S. aureus*, mas não pela maioria dos outros estafilococos (MURRAY *et al.*, 2004; KONEMAN, 2001).

### 2.4. Resistência de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos

O uso de substâncias antimicrobianas na prática médica teve início antes mesmo da descoberta dos microrganismos. Relatos apontam que Hipócrates (460 – 377 a.C.) realizava a lavagem dos ferimentos com vinho, com a finalidade de evitar infecções (FERREIRA, 1997 apud LIMA, 2007).

Os **Antibióticos** são, por definição, substâncias químicas, produzidas por bactérias ou fungos filamentosos, que possuem actividade bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos (PAIVA NETTO, 1989 apud LIMA, 2007).

A **Resistência** é relativa insusceptibilidade do microrganismo para um tratamento em condições particulares (GILBERT McBAIN, 2003 apud LIMA, 2007).

A resistência pode ser intrínseca ou extrínseca. A resistência intrínseca é baseada em características inerentes ao microrganismo, como fisiologia e particularidades estruturais da estirpe, por exemplo morfologia e composição da parede celular, sendo pouco provável de ser transmitida para outros microrganismos; assim, não representando risco de disseminação do gene.

A resistência adquirida (extrínseca) ocorre devido a mutações ou aquisição de ADN de outras bactérias (WRIGHT, 2005 apud LIMA, 2007), por meio de mecanismos de transferência de material genética, como: conjugação (transferência de genes por meio da formação de *pilus* após contacto directo célula-célula, diferindo dos demais), transformação (aquisição de ADN livre directamente do meio), transdução (o ADN é transferido por meio de bacteriófagos) e transposição (transferência de genes de um local do ADN para outro por meio de transposons) (JAWETZ, 2009).

#### **2.4.1. *S. aureus* resistente à Penicilina**

Em 1944, dois anos depois da introdução da penicilina, se reportou o primeiro *S. aureus* resistente a penicilina. Se encontrou que este produz uma enzima penicilinase ( $\beta$ -lactamase) que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina.

Como se mencionou antes, na actualidade, em muitas regiões geográficas a resistência a penicilina devida a produção da  $\beta$ -lactamase excede a 90% (CAVALIERE *et al.*, 2005).

#### **2.4.2. *S. aureus* resistente à Oxacilina (ORSA): situação actual**

A Oxacilina e a Meticilina são penicilinas semi-sintéticas que são estáveis à  $\beta$ -lactamase estafilocócica graças a colocação estratégica de certas cadeias laterais na molécula. Estes antibióticos foram desenvolvidos especificamente para o tratamento de infecções causadas por *S aureus* produtoras de  $\beta$ -lactamase (CAVALIERE *et al.*, 2005).



A resistência a antibióticos do tipo meticilina apareceu pela emergência do gene *mecA*. Este gene codifica para uma nova proteína PBP2a que se une a penicilina. Esta proteína participa na síntese da parede celular apesar da presença de antibióticos tipo meticilina. Inicialmente, os primeiros isolamentos se denominaram *S. aureus* resistente a meticilina, posteriormente estas denominaram-se mais apropriadamente *S. aureus* resistente a Oxacilina ou ORSA posto que é a Oxacilina o antibiótico que geralmente se usa nas provas de laboratório. Os ORSA se consideram resistentes a todas as penicilinas penicilinase-estáveis tais como Oxacilina, Meticilina, Nafcilina, Cloxacilina, e Dicloxacilina. Ainda mais, todos os ORSA são resistentes a todos os demais agentes  $\beta$ -lactâmicos.

Os ORSA usualmente são resistentes a múltiplas classes de agentes entre os que se incluem macrólidos, lincosamidas, e tetraciclina. Também podem ser resistentes às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Os ORSA podem demonstrar resistência homogênea ou heterogênea à Oxacilina (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Estudos de Almeida *et al.* (2007), em hospital Brasileiro, apontam uma prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina na ordem de 16,3%.

Em Moçambique um estudo recente, de Chuquela (2009), feito no berçário do HCM, visando determinar a frequência de *S. aureus* resistente à Oxacilina, teve como resultado, das 89 amostras de roupa de bebês pesquisadas, um crescimento na ordem de 52,8% (47 roupas) onde 48,9% (23 roupas) era constituído de *S. aureus* resistentes a Oxacilina.

## **2.5. Modos de acção dos antimicrobianos**

Os agentes antimicrobianos se classificam de acordo com os seus modos específicos de acção contra as células bacterianas. Estes agentes podem:

- Interferir com a síntese da parede celular;
- Inibir a síntese de proteínas;
- Interferir com a síntese de ácido nucleico, ou

- Inibir uma rota metabólica.

Os modos de acção dos agentes antimicrobianos contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas são muito similares (CAVALIERE *et al.*, 2005).

### **2.5.1. Actividade dos $\beta$ -lactâmicos em bactérias gram-positivas**

Pelo facto de as bactérias gram-positivas não possuírem uma membrana externa, os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos se difundem através da parede celular. Os seguintes passos são similares a aqueles para as bactérias gram-negativas. Nas células sensíveis, as moléculas  $\beta$ -lactâmicas se unem as PBPs, o que resulta em paredes celulares debilitadas e lise celular (CAVALIERE *et al.*, 2005).

### **2.5.2. Interferência na membrana citoplasmática**

As moléculas de polimixina se difundem através da membrana externa e parede celular de células susceptíveis face a membrana citoplasmática. Estas se unem a membrana citoplasmática, alteram e desestabilizam. Isto causa o derrame do citoplasma para o exterior da célula, o que resulta em morte celular. Os agentes antimicrobianos que interferem na membrana citoplasmática são bactericidas (matam as bactérias) (CAVALIERE *et al.*, 2005).

### **2.5.3. Interferência da síntese de proteínas mediante a ligação a subunidade ribossómica 30S**

As **Tetraciclínas** (exemplo: Tetraciclina, Minociclina e Doxiciclina) se unem a subunidade 30S do ribossoma e bloqueam a aderência do ARN de transferência (tRNA). Posto que não se podem agregar mais aminoácidos à cadeia de proteínas que está em crescimento, a síntese de proteínas é inibida. A acção das tetraciclínas é bacteriostática (que inibe o crescimento dum bactéria sem matá-la).

**Os aminoglicosídeos** (exemplo: Gentamicina, Amicacina e Estreptomicina) também se unem a subunidade 30S do ribossoma e podem bloquear a síntese de proteínas de duas

maneiras diferentes. O efeito total desses mecanismos é bactericida (CAVALIERE *et al.*, 2005).

#### **2.5.4. Inibição da síntese de proteínas mediante a subunidade ribossômica 50S**

Os **Macrólidos** (exemplo: Eritromicina, Azitromicina e Claritromicina) e as **Lincosamidas** (ex. clindamicina) se aderem a subunidade ribossômica 50S provocando o término do crescimento da cadeia proteica e a inibição da síntese de proteínas. Estes são primordialmente bacteriostáticos.

O **Cloranfenicol** também une-se a subunidade 50S do ribossoma e interfere na união de aminoácidos na proteína em crescimento. Os agentes antimicrobianos que inibem a síntese de proteínas desta forma são bacteriostáticos (CAVALIERE *et al.*; 2005).

## CAPÍTULO III - METODOLOGIA

### 3.1. Área de estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de análises clínicas, sector de Microbiologia do Hospital Central de Maputo.

O Laboratório de Análises Clínicas, Sector de Microbiologia, Secção de Bacteriologia, do Hospital Central de Maputo, está situado entre as avenidas Eduardo Mondlane, Salvador Allende, Tomás Nduda e Agostinho Neto. Este é até hoje a maior Unidade Hospitalar em Moçambique e possui diversos serviços, tais como: Serviços de Urgência, Maternidade, Estomatologia, Dermatologia, Oftalmologia, Ortopedia, Cirurgia, Pediatria, Urologia, dentre outros.

O Laboratório de Análises Clínicas possui três Sectores, nomeadamente: o Sector de Hematologia, o de Bioquímica e o de Microbiologia e ainda uma sala de colheitas das amostras. O sector de Microbiologia subdivide-se em três Secções: Serologia, Bacteriologia e Parasitologia.

A Secção de Serologia realiza testes para HIV, sífilis, espermograma e testes em látex de toxoplasmose, realiza ainda exames citoquímicos de líquidos orgânicos.

A Secção de Parasitologia, através de amostras de fezes realiza exame a fresco para a pesquisa de amido, gorduras e quistos e exame parasitológico para a pesquisa de diversos parasitas, e através do exame microscópico nas amostras de urinas procura a presença de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais, cilindros que são indicativos de infecção urinária.

Na Secção de Bacteriologia, não só as bactérias responsáveis pela infecção são isoladas e identificadas, assim como é feito o teste de sensibilidade aos antibióticos, com a finalidade de indicar a terapia antimicrobiana eficaz para os agentes responsáveis pela infecção.

### 3.2. Natureza do estudo

Do ponto de vista da forma de abordagem do problema a pesquisa é Quantitativa: considera que tudo pode ser quantificável, o que significa traduzir em números as informações colectadas para classificá-las e analisá-las. Neste sentido foi usada a estatística descritiva.

A pesquisa é também considerada exploratória, na medida em que estudos a semelhança deste são escassos na nossa província.

### 3.3. Amostragem e amostra

A amostragem foi categoricamente probabilística na qual a selecção da amostra foi feita por Cachos (*Clusters*): durante o período de pesquisa somente 101 cepas apresentaram crescimento de *Staphylococcus* sp., sendo que este número foi submetido a testes específicos para identificação de *S. aureus*, verificando-se 50 cepas positivas (*S. aureus*), este número constituiu a subamostra (cacho *S. aureus*).

Com base no número de cepas de *S. aureus* obtidas e testadas foi calculada a margem de erro com base na fórmula seguinte

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{(p \times q)}{n}}$$

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{76 \times 24}{50}}$$

$$\sigma_p = 6\%$$

**Onde:**

- N tamanho da amostra;
- $\sigma_p$  erro padrão ou desvio da percentagem com que se verifica determinado fenómeno;
- p percentagem do fenómeno;
- q percentagem complementar.

Na fórmula, 76% é a prevalência de MRSA, usada para calcular a margem de erro, que foi igual a 6%, o que significa que o nível de confiança é de 94%.

Estes 94% querem dizer o seguinte: se realizarmos uma outra pesquisa, com uma amostra do mesmo tamanho, nas mesmas datas e locais e com o mesmo instrumento de recolha de dados, há uma probabilidade de 94% de que os resultados sejam os mesmos (e uma probabilidade de 6% de que tudo difira).

### **3.4. Fontes de material biológico**

Foram examinados os seguintes materiais biológicos:

- Culturas de material do trato urogenital;
- Culturas de material da garganta e do escarro;
- Culturas de exsudatos e transudatos;
- Hemoculturas: para diagnóstico de bacteremias e de septicemias;
- Culturas do líquido cefalorraquidiano: apesar de ser limitado o número de bactérias que produzem meningites ou meningocelalites, elas assumem grande importância, tendo em vista as graves consequências e as sequelas que podem advir dessas infecções.

### **3.5. Identificação e isolamento das cepas de *Staphylococcus aureus***

Para identificação, recorreu-se a técnica de coloração de Gram, fermentação do Manitol (vide figura 6 no apêndice B), e testes para avaliar a produção das enzimas catalase e coagulase.

A **prova de coagulase** classifica os estafilococos em *Staphylococcus aureus* (coagulase-positivos) e *Staphylococcus epidermidis* ou *Staphylococcus saprophyticus* (coagulase-negativos).

Para a realização da prova usou-se plasma humano estéril. As colónias foram inoculadas na solução de plasma em tubo e incubadas a 37°C. As foram feitas depois de 2 horas e depois 24 horas.

Para a realização da **prova de catalase** colocou-se uma porção colónias num tubo contendo 0,3 ml de peróxido de hidrogénio (a temperatura ambiente). A formação de bolhas indicou positividade ao teste, segundo protocolado por Moura *et al.* (2006).

### **3.6. Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA)**

Uma vez que já isoladas as colónias de um microrganismo previamente identificado como patogénico potencial, procedeu-se da seguinte maneira para realização do TSA:

- Selecionou-se as colónias
- Preparou-se uma suspensão do inóculo
- Padronizou-se a suspensão do inóculo
- Inoculou-se as colónias na placa
- Colocou-se os discos de antibiótico
- Incubou-se a placa
- Mediu-se as zonas de inibição
- Interpretou-se os resultados.

#### **3.6.1. Selecção das Colónias**

Um dos passos mais importantes no processo do TSA é a preparação do inóculo. Esta fase envolveu a selecção de colónias apropriadas para o teste, sua suspensão em soro fisiológico e padronização da suspensão.

Primeiro, seleccionou-se várias colónias das bactérias que em análise. Selecionou-se entre 4 a 5 colónias, em vez de uma pois assim as chances de detectar a resistência são maiores.

Foi usada uma zaragatoa para recolher da placa somente colónias bem isoladas para evitar cultivo misto. Caso não houvesse colónias bem isoladas fazia-se uma subcultura em nova placa.

### **3.6.2 Preparação e padronização da suspensão de inóculo**

Existem dois métodos para a preparação do inóculo: suspensão directa (vide figura 8, apêndice D) de colónias e fase logarítmica de crescimento. Em ambos métodos a turbidez da suspensão deve ser padronizada, comparando ao padrão de 0,5 de McFarland (o que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células por mililitro).

Nesta pesquisa foi usado o método de suspensão directa no qual procedeu-se da seguinte forma: padronizou-se o inóculo ao mesmo tempo que se preparava a suspensão; suspendeu-se as colónias em solução salina; ajustou-se o inóculo a uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 de McFarland. Comparou-se a turbidez das suspensões pondo os tubos frente a um papel branco.

As suspensões devem ser utilizadas como inóculo dentro dos 15 minutos seguintes.

### **3.6.3. Preparação para a inoculação na placa**

Retirou-se os discos do congelador de modo que atingissem a temperatura ambiente, uma a duas horas para minimizar a condensação e reduzir a possibilidade da humidade afectar a concentração dos agentes antimicrobianos.

Colocou-se as placas de Ágar Mueller-Hinton (MHA) entreabertas na incubadora por 10 a 15 minutos para eliminar o excesso de humidade. A placa de MHA deve ter espessura de 4 mm de meio de cultura.

Agitou-se a suspensão para homogeneizar e logo submergiu-se uma zaragatoa estéril na suspensão. Removeu-se o excesso de líquido da zaragatoa pressionando-a contra a parede do tubo.



### **3.6.4 Inoculação na placa**

Começando pela parte superior da placa MHA, inoculou-se na superfície com zaragatoa (vide figuras 9, 10 e 11 no apêndice).

Cobriu-se toda a placa estriando ida e volta de um bordo para outro. Rodou-se a placa aproximadamente 60° e repetiu-se o mesmo procedimento. Rodou-se mais uma vez a placa 60° e inoculou-se, como anteriormente, toda a placa pela terceira vez. Esse procedimento visou garantir que o inóculo estivesse distribuído homogeneamente.

### **3.6.5. Aplicação dos discos de Antibióticos**

Colocou-se os discos com os agentes antimicrobianos dentro de 15 minutos seguintes a inoculação da placa MHA. Os discos foram colocados um a um na placa de 100 mm, de modo a serem no máximo cinco. Pressionou-se cada disco firmemente para assegurar o contacto completo com a superfície de ágar.

Para cada cepa foram preparadas duas placas com vista a obter o perfil de sensibilidade e verificar a resistência à Meticilina. A primeira placa continha os seguintes discos: Canamicina (K), Ticarcilina (TI), Amicacina (AK) e Minociclina (MI); a segunda placa continha: Cloranfenicol (C), Piperacilina/tazobactam (TZP), Trimetoprima/Sulfametoxazol (SXT) e Meticilina (M). Para amostras de urina foi acrescido um disco de Nitrofurantoína (F). As cepas que revelaram resistência à Meticilina foram também testadas com Ticarcilina com Clavulanato (TIM) (vide estruturas de antibióticos, figuras 1 a 4 em anexo).

### **3.6.6. Incubação das placas**

Inverteu-se as placas e incubou-se a 37°C por 16 a 18 horas.

### 3.6.7. Medição das zonas de inibição

Depois de retirar-se a placa da incubadora, examinou-se minuciosamente a placa para ver se o crescimento era uniforme. As leituras dos halos foram medidas em milímetros usando uma régua milimétrica (vide figura 12 no apêndice).

Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nú) foram medidos, incluindo o diâmetro do disco. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a “olho nú”. Dependendo do diâmetro e para cada antibiótico, as bactérias foram classificadas em sensíveis (S) ou resistentes (R).

### 3.7. Verificação da produção de $\beta$ -lactamase

A prova mais comum de  $\beta$ -lactamase usa um substrato  $\beta$ -lactâmico cromogênico (como uma cefalosporina) que muda de cor quando seu anel  $\beta$ -lactâmico é hidrolisado (vide figura 7 no apêndice).

Procedimento:

1. Inoculou-se uma grande quantidade da bactéria a examinar na fita-substrato  $\beta$ -lactâmico cromogênico usando a ansa de inoculação;
2. Deixou-se a temperatura ambiente e verificou-se a mudança de cor na fita amarela. A mudança de amarelo para verde/azul indica um resultado positivo do teste e se não ocorre alteração é negativo.

### 3.8. Variáveis de estudo

Foram consideradas variáveis para o presente estudo, as seguintes:

- Resistência à meticilina;
- Sensibilidade à meticilina;
- Produção de  $\beta$ -Lactamase.

Das variáveis listadas a Sensibilidade e Resistência à Meticilina são variáveis dependentes, enquanto a produção de  $\beta$ -Lactamase é uma variável categoricamente independente.

### **3.9. Análise de dados**

Para a análise, interpretação e cruzamento dos dados foi utilizada a estatística descritiva e inferencial.

No tratamento estatístico e cruzamento dos dados utilizou-se uma versão do software *Statistical Package for Social Science* (SPSS) na versão 17.0 para obtenção de frequências de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes, resistência e sensibilidade antimicrobiana e para testar a dependência das variáveis, pelo cálculo do Qui-quadrado. O software Microsoft Excel 2007 foi usado como folha de organização dos dados colectados que posteriormente foram exportados para o SPSS.

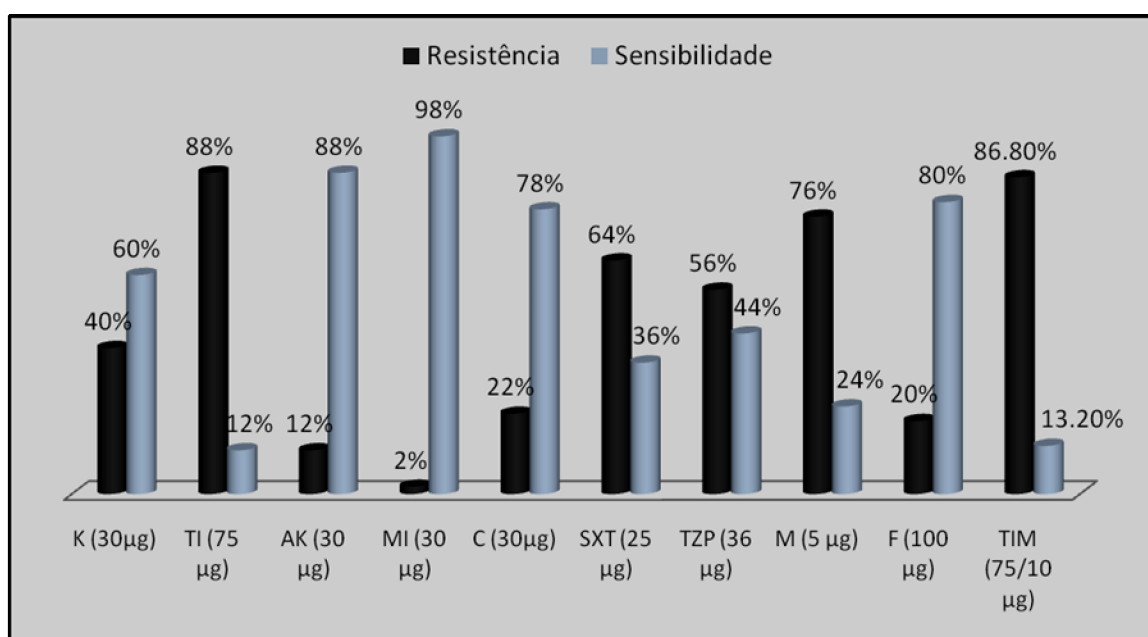
## CAPÍTULO IV- ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1. Apresentação de resultados

#### 4.1.1. Leitura do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (T.S.A)

A média da **Prevalência** de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina no período de Fevereiro a Maio foi de 76%.

A distribuição da resistência à outros antibióticos testados com vista a obter um perfil de sensibilidade e resistência está também plasmada na gráfico 1.



**Gráfico 1:** Perfil de sensibilidade e resistência de *S. aureus* obtida pelo método Kirby-Bauer.

Do Gráfico acima: **K**-canamicina, **TI**-ticarcilina, **AK**-amicacina, **MI**-minociclina, **C**-cloranfenicol, **SXT**-trimetoprima/sulfametoxazol, **TZP**-piperacilina com tazobactam, **M**-metilicina, **F**-nitrofurantoína, **TIM**-ticarcilina com clavalunato

Observa-se a maior sensibilidade de *Staphylococcus aureus* face à Minociclina (98%), Amicacina (88%), Cloranfenicol (78%) e Nitrofurantoína (75%), sendo o primeiro

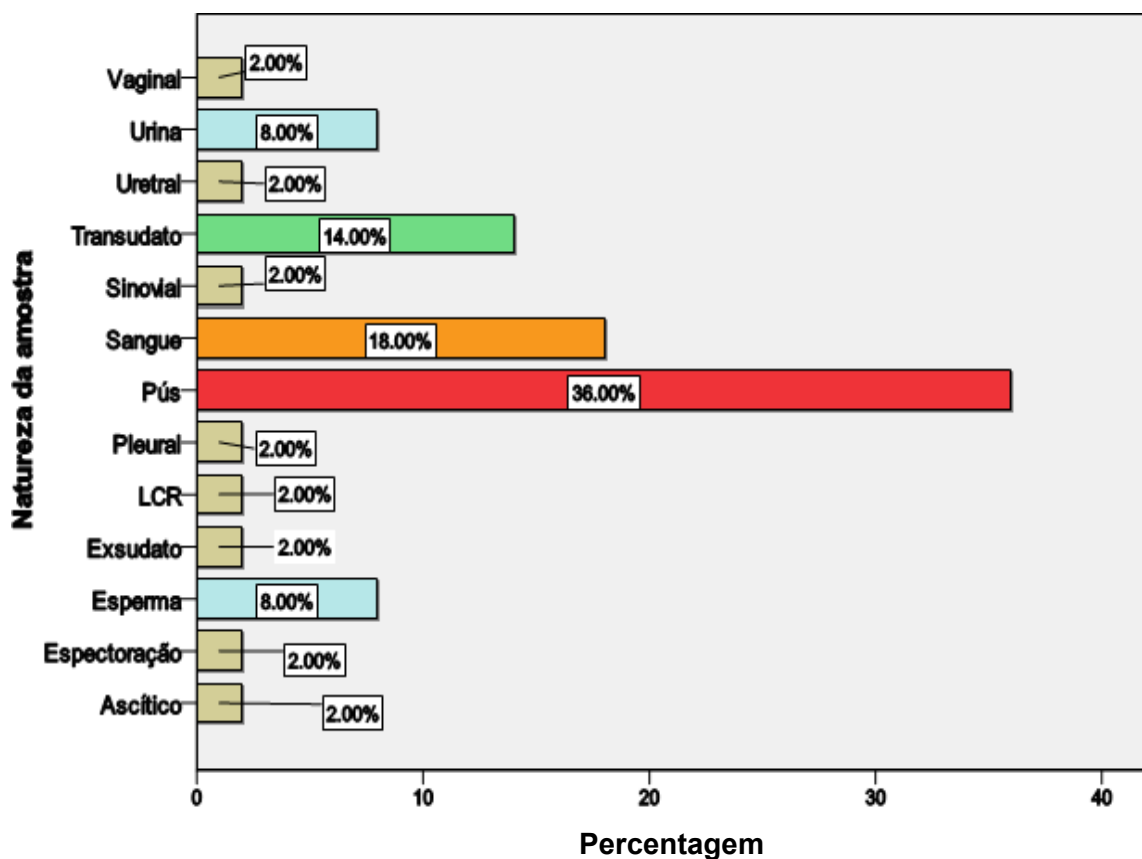
antibiótico pertencente a classe das Tetraciclina, o segundo a classe de Aminoglicosídeos, o terceiro e o último a classe de Drogas únicas.

Elevada resistência de *Staphylococcus aureus* é verificada face aos seguintes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: Ticarcilina (88%, n=50), Ticarcilina com clavulanato (86.8%, n=38), Meticilina (76%, n=50) e Trimetoprima-sulfametoxazol (64%, n=50).

Relativamente a Nitrofurantoína (F), é de ressaltar que é um antibiótico empregado nas infecções do trato urinário. Assim sendo, somente 4 das 50 cepas foram testadas com Nitrofurantoína, por serem de proveniência urinária, das quais 25% (n=4) apresentou resistência e 75% foi sensível.

#### **4.1.2. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em função da natureza da amostra**

Em função da natureza da amostra observa-se (vide gráfico 2), numa amostra n=50, a maior ocorrência de *Staphylococcus aureus* em secreções não estéreis (pús=36%, transudato=14%), e em número considerável em líquidos estéreis (sangue=18%).



**Gráfico 2:** Frequência de *S. aureus* em função da natureza da amostra.

Algumas amostras não estéreis como secreções vaginais e uretrais, amostras de expectoração, também apresentam ocorrência muito baixa (2%, n=50) de *Staphylococcus aureus*.

#### 4.1.3. Prova de $\beta$ -lactamase

Foram submetidas a este teste todas as cepas que se apresentaram resistentes à Meticilina. Do teste, observa-se (Vide Tabela 1) que a maioria (74%, n=50) das cepas testadas produzem a enzima  $\beta$ -lactamase, enquanto 26% (n=50) não a produzem.

**Tabela 1:** Resultados da prova cromogênica de  $\beta$ -lactamase.

<b>Produção de <math>\beta</math>-lactamase</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>%</b>
Negativo ao teste	13	26.0
Positivo ao teste	37	<b>74.0</b>
Total	50	100.0

Tomando em conta a produção de  $\beta$ -lactamase em relação a resistência a Meticilina, pode-se observar que o valor da resistência (76%) é próximo ao da produção de  $\beta$ -lactamase (74%) e o da sensibilidade (24%) é próximo a não produção de  $\beta$ -lactamase (26%).

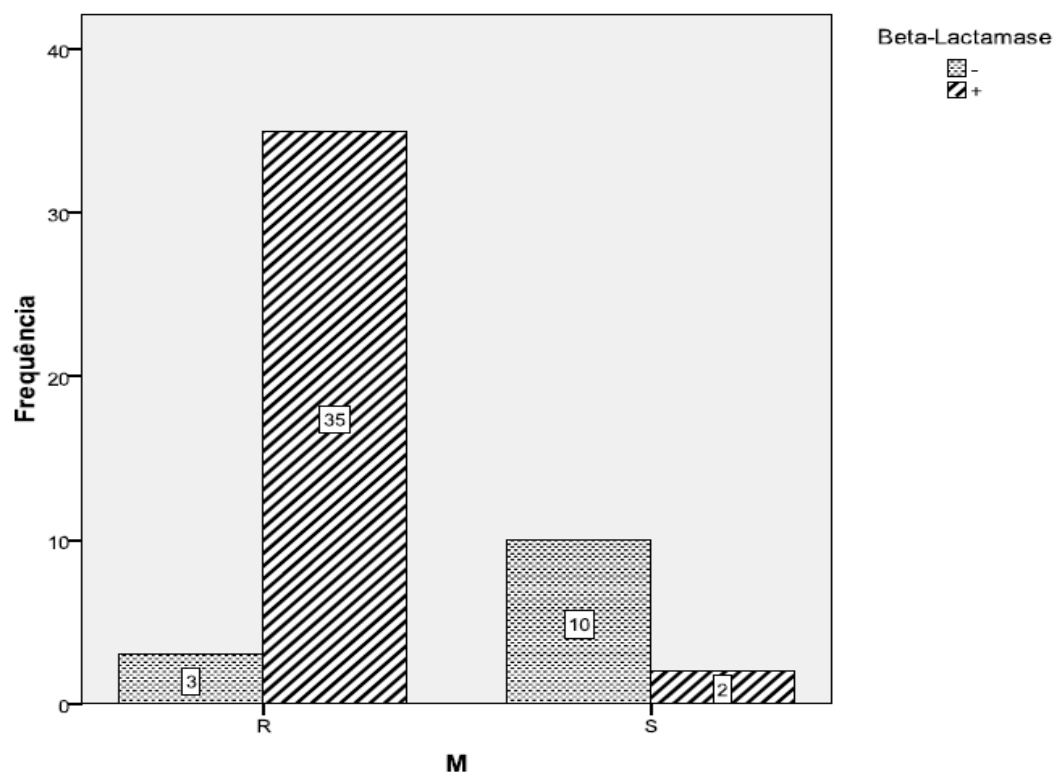
A prova de  $\beta$ -lactamase foi efectuada com objectivo de pesquisar a produção ou não da enzima responsável pela degradação do anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos da classe com a mesma designação. Portanto, esse teste é aliado ao teste de sensibilidade antibiótica. Deste modo, ele foi efectuado após a leitura do comportamento das cepas face à Meticilina, podendo servir os resultados do teste  $\beta$ -lactamase para subsidiar o perfil de sensibilidade e resistência de *S. aureus* face à Meticilina.

#### **4.1.4. Relação Resistência à Meticilina e produção de $\beta$ -Lactamase**

Do total da amostra dada por *S. aureus* (n=50), 76% foi resistente à Meticilina (tabela 2).

Desagregando esse dado em função da resistência à Meticilina, temos, das 38 cepas resistentes, a maioria 92.1% (35 cepas) produz  $\beta$ -lactamase enquanto 7.9% (3 cepas) não produz  $\beta$ -lactamase.

Dentre as 12 cepas sensíveis, a maioria 83.3% (10 cepas) não produz a enzima  $\beta$ -lactamase enquanto 16.7% (2 cepas) produz a enzima (vide gráfico 3).



**Gráfico 3.** Cruzamento das variáveis Resistência e Sensibilidade a Meticilina e Produção de  $\beta$ -lactamase.

O resultado do cruzamento pode ser consubstanciado pelo valor obtido do teste do Qui-quadrado (tabela 3 em anexo).



## 4.2. Discussão

A Determinação da prevalência de ocorrência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes é uma importante estratégia epidemiológica para a proposição de medidas de prevenção e controle e também um dos critérios mais utilizados para a escolha judiciosa da terapêutica. Neste estudo o *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, apresentou uma prevalência de 76%, um valor elevado, comparativamente ao estudo de Chuquela (2009), no berçário do Hospital Central de Maputo, onde se obteve 48,9% de prevalência. Todavia o nosso resultado está em concordância àqueles obtidos em estudos realizados em hospitais Brasileiros que demonstraram valores variando entre 40% a 80% de prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes.

A razão da elevada prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes pode ser justificada pelo uso abusivo e descontrolado de antibióticos, bem como a falta de definição clara dos critérios na escolha do tratamento. Ademais, Pereira (2002) alerta que o uso de cefalosporinas eleva possibilidade do aparecimento de *Enterococcus* resistentes à Vancomicina, e esta condição de resistência pode ser transferida por mediação de plasmídeos à outras bactérias incluindo *Staphylococcus aureus*. Do mesmo modo Oliveira *et al* (2001) referem que nos hospitais, o tratamento prolongado com antibióticos de amplo espectro, como a Vancomicina, tornam difícil o controle de infecções por *Staphylococcus aureus*. Contudo, os resultados obtidos da presente pesquisa, por si só não esclarecem a razão deste elevado valor de prevalência devido a falta de informação clínica anexa as amostras analisadas.

O desenvolvimento da resistência a antibióticos e a elevada vulnerabilidade à infecção por *Staphylococcus aureus* é propiciada por este possuir um conjunto de mecanismos de virulência e grande versatilidade de estratégias patogênicas, como se pode ver do teste de sensibilidade antimicrobiana que existem cepas que não produzem a enzima  $\beta$ -lactamase mas são resistentes por outros mecanismos que não puderam ser comprovados pela metodologia usada nesta pesquisa.

Concernente ao perfil de sensibilidade e resistência de *Staphylococcus aureus*, os nossos resultados apontam valores altos de sensibilidade face a aminoglicosídeos (foi testada a Amicacina e a Canamicina), Tetraciclina (testou-se a Minociclina) e Cloranfenicol, este resultado é paradoxal ao estudo de Oliveira *et al* (2001) no qual afirma que

*O aumento da frequência de infecções hospitalares causadas por Staphylococcus aureus metilino-resistentes é acompanhado pelo aumento da resistência a muitos outros antimicrobianos com actividade anti-estafilocócica, como os Aminoglicosídeos, Cloranfenicol, Lincosamídeos, Macrolídeos, Quinolonas e Tetraciclina.*

A avaliação da resistência aos Aminoglicosídeos é importante, uma vez que esta classe de antibióticos pode ser associada a  $\beta$ -lactâmicos e Glicopeptídeos para tratamento de infecções graves. Durante o período avaliado a resistência média a Amicacina (aminoglicosídeo testado) foi 12%. Este resultado é inferior ao obtido por Almeida *et al* (2007), realizado com amostras do hospital de Londrina-Paraná, no período de 2001 a 2004, onde se constatou taxas de resistência na ordem de 67%. O valor de resistência à Canamicina obtido foi de 40%. Esses valores mostram de forma clara que a Amicacina assim como a Canamicina, são aminoglicosídeos que ainda podem ser usados para obtenção dum efeito sinérgico em associação com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

A maior sensibilidade antibiótica verificada face a Aminoglicosídeos (AK), Tetraciclina (MI) e Cloranfenicol (C), pertencente a classe de Drogas únicas, pode estar aliada ao facto de essas classes antibióticas inibirem a síntese proteica em nível ribossómico, o que impossibilita a expressão de enzimas promotoras de resistência comparativamente ao mecanismo de acção dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que agem sobre proteínas funcionais (enzimas  $\beta$ -lactamases activas) podendo por esta via existir persistência da actividade de  $\beta$ -lactamases para construção da parede bacteriana mesmo em presença de antibióticos, no caso de alteração de proteínas-alvo. E qual seria o significado da sensibilidade inicialmente referida? Isto significa que esses antibióticos podem ser eleitos para o tratamento de infecções estafilocócicas, embora uma parte deles tenha apenas efeito bacteriostático (é o caso do Cloranfenicol e Minociclina).

A elevada resistência observada face aos antibióticos Ticarcilina (88%) e Ticarcilina combinada com clavulanato (86.8%) é explicada pelo mesmo mecanismo de resistência de *Staphylococcus aureus* à Meticilina, uma vez que estes antibióticos pertencem todos a classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, onde faz parte a Meticilina.

A Nitrofurantoína também inibe a síntese proteica em nível ribossômico e o seu alto grau de sensibilidade (75%, n=4), indica a sua aplicação para infecções estafilocócicas do trato urinário.

Com relação ao antibiótico Sulfametoxazol, este apresentou um considerável valor de resistência (64%, n=50). Este resultado é contrário a afirmação de LIMA (2007) onde a combinação de Sulfametoxazol (uma Sulfonamida) com a Trimetoprima (um inibidor de  $\beta$ -lactamase) é referida como resultante num efeito sinérgico. Apesar desta propriedade declarada por LIMA (2007) o nosso resultado mostra que o antibiótico não é de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas.

Com referência aos resultados da relação Resistência à Meticilina com a produção de  $\beta$ -Lactamase, observou-se que uma maior percentagem de cepas resistentes produz a enzima  $\beta$ -lactamase (92.1%), o que sugere que a resistência a metilina depende da produção de  $\beta$ -lactamase. Por outro lado, com relação as 38 cepas resistentes, observou-se uma menor resistência que não produz  $\beta$ -lactamase, isto pode justificar-se pela existência de um outro mecanismo de resistência que não depende da produção da enzima  $\beta$ -lactamase, tal como referencia Jawetz (2009), que a resistência a metilina pode também ser resultado da expressão duma proteína de ligação ao antibiótico alterada (proteína PBP2a, versão de baixa afinidade da proteína PBP), codificada pelo gene *mecA* localizado no nucleóide e não no plasmídeo.

Ainda relativo ao cruzamento das variáveis resistência e sensibilidade à metilina e produção de  $\beta$ -lactamase, observou-se das 12 cepas sensíveis que a maioria (83.3%) não produz a enzima  $\beta$ -lactamase, porém existe uma menor sensível e produtora de  $\beta$ -lactamase (16.7%). Pelo facto da enzima  $\beta$ -lactamase de *S. aureus* ser induzível, isto é, ser produzida apenas quando a bactéria é exposta ao antibiótico, pode ser que o antibiótico tenha morto as bactérias antes que uma quantidade suficiente da enzima fosse

produzida para inactivar o antibiótico, possivelmente devido ao menor tamanho do inóculo – isto justifica a percentagem de cepas sensíveis que produzem  $\beta$ -lactamase. Esta hipótese é também sustentada por Trabulsi & Alterthum (2008).

O resultado do cruzamento das variáveis pode ser complementado com o resultado do teste do Qui-quadrado (*Chi-square*). Portanto, do cruzamento das variáveis “produção de  $\beta$ -lactamase” e “resistencia à Meticilina” para verificação da dependência das duas variáveis, obteve-se um valor de qui-quadrado (*chi-square*) representado na tabela 3 (anexo 4), segundo o teste de independência de Qui-quadrado.

O valor de Qui-quadrado obtido tem um nível de significância igual 0,000 que é inferior a 0,0005, o que nos permite rejeitar a hipótese nula que diz “a resistência à Meticilina não depende da produção da enzima  $\beta$ -lactamase” e consequentemente aceitar a hipótese que diz que a resistência à metilina depende da produção da enzima  $\beta$ -lactamase.

## CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 5.1. Conclusões

Os resultados obtidos e as análises efectuadas no decorrer do presente trabalho permitem concluir que:

- A prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes no período avaliado foi alta.
- *Staphylococcus aureus* apresenta alta sensibilidade face a Amicacina, Canamicina, Minociclina, Cloranfenicol e Nitrofurantoína.
- A resistência de *Staphylococcus aureus* à Meticilina é acompanhada pela resistência à outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.
- *Staphylococcus aureus* ocorre com maior frequência em líquidos não estéreis (pús e transudatos) assim como líquidos estéreis (sangue).
- A resistência à Meticilina depende da produção de  $\beta$ -lactamase.
- Existe um outro mecanismo de resistência à metilina de *Staphylococcus aureus* que não depende da produção de  $\beta$ -lactamase.

## **5.2. Recomendações**

Ao finalizar este estudo são levantadas como recomendações as seguintes:

### **Para pesquisadores**

Sugere-se um maior tempo para a consecução deste tipo de pesquisa o que possibilita a obtenção de uma amostra grandemente representativa e consequentemente resultados mais generalizáveis.

Recomenda-se também a inclusão de informação clínica do doente na matriz de recolha de dados para o conhecimento da origem das infecções estafilocócicas verificadas.

### **Para médicos sugere-se**

O uso de Amicacina, Canamicina, Minociclina, Cloranfenicol e Nitrofurantoína para o tratamento de doenças estafilocócicas.

A realização de periódica de testes de sensibilidade *in vitro* para o monitoramento da resistência que pode comprometer o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes.

### **À Universidade Pedagógica**

Sugere-se o incentivo de mais formandos para o desenvolvimento de pesquisas aplicadas na área de saúde pública com vista a conceber professores com conhecimentos apurados nesta área pretendendo assegurar a resolução de problemas básicos de saúde nas escolas desprovidas de centros de saúde e ainda ensinar e educar construindo atitudes e convicções salutaras nos alunos. Não só, mas também, visando colocar o estudante em contacto com técnicas laboratoriais em geral, consolidando o manuseamento de microscópio e técnicas de semeadura e identificação de microrganismos, em particular.

## CAPÍTULO VI - BIBLIOGRAFIA

1. ALMEIDA, *et al.* *Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de Staphylococcus aureus isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares*. Revista Eletrônica de Enfermagem, versão 09, p.489-495. 2007. [OnLine] Disponível via URL:[http:// www.fen.ufg.br/revista/v9/n2/v9n2a15.htm](http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n2/v9n2a15.htm). Acessado a 06 de Maio de 2010.
2. BONOMO, Robert A. & TOLMASKY, Marcelo. *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics: Mechanisms, Dissimination, and Prospects for Inhibition*. ASM Press. Washington, 2007.
3. CAVALIERI, *et al.* *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Editora coordenadora Marie B. Coyle. American Society for Microbiology. United States of America, 2005.
4. CHUQUELA, Sheila Helena. *Frequência de S. aureus Resistente a Oxacilina no berçário do Hospital Central de Maputo*. Maputo, 2005.
5. DA SILVA, Eadn Lúcia & MENEZES, Estera Muszkat. *Metodologia da Pesquisa e Elaboração de Dissertação*. 3ª Edição revisada e actualizada. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Laboratório de Ensino a Distância. Florianópolis, 2001.
6. DE SOUZA, Louremi Bianchi Gualda & FIGUEIREDO, Beatriz de Barros. *Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá*. RBAC, vol. 40(1). Brasil, 2008. p.31-34. [OnLine] Disponível via URL:[http://www.Google.com.br/ RBAC, vol. 40\(1\)/pdf](http://www.Google.com.br/RBAC_vol_40(1).pdf). Acessado a 21 de Maio de 2010.
7. JAWETZ, Melnick & ADALBERG, G. *Microbiologia Médica*. 24ª edição. McGraw-Hill. Rio de Janeiro, 2009.

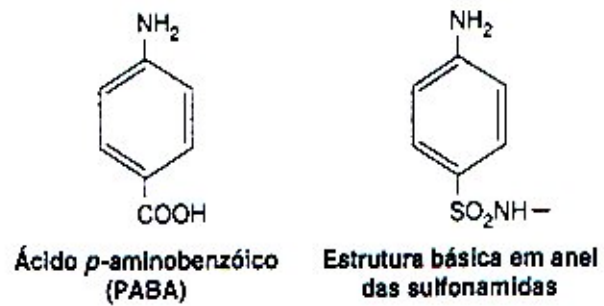
8. JUNIOR *et al.* *Prevalência de Staphylococcus sp resistentes à meticilina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte.* In Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasil, 2009. p.179-182. [OnLine] Disponível via URL:[http:// www.Google.com.br/Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical p.179-182/pdf](http://www.Google.com.br/Revista_da_Sociedade_Brasileira_de_Medicina_Tropical_p.179-182/pdf). Acessado a 15 de Abril de 2010.
9. KONEMAN, W. E, S. D. Allen, W. M. Juavada, P. C. Schechenberg e W. C. J. Winner. *Diagnóstico Microbiológico, Textos e Atlas Coloridos*, 5ª edição. Editora Médica e Científica. Brasil, 2001.
10. MELO *et al.* *Bactérias isoladas de ponta de cateter venoso central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA.* RBAC, vol. 39. Brasil, 2007. p.115-118. [OnLine] Disponível via URL:<http://www.Google/revista/v39/n2/v9n2a15.htm>. Acessado a 27 de Abril de 2010.
11. MOURA *et al.* *Técnicas de Laboratório.* 3ª Edição. Editora Atheneu.Rio de Janeiro, 2006. p. 228-229
12. MURRAY *et al.* *Microbiologia Médica.* 3ª Edição. Guanabara koogan. Rio de Janeiro, 1998. p.719
13. MURRAY *et al.* *Microbiologia Médica.* 4ª Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004. p.191-193
14. NETTO *et al.* *Staphylococcus aureus: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária.* Acta Scientiarum. Maringá, v. 23, n. 3, Brasil, 2001. p. 709-712. [OnLine] Disponível via URL:[http:// www.Google.com.br/ Staphylococcus aureus+origem comunitária/pdf](http://www.Google.com.br/Staphylococcus_aureus+origem_comunitaria/pdf). Acessado a 04 de Março de 2010.
15. NOGUEIRA *et al.* *Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital universitário.* Rev. enferm. UERJ. jan/mar; 17(1):96-101. Rio de Janeiro, 2009. p.96 [OnLine] Disponível via URL:[http://www.Google.com.br/ Rev. enferm. UERJ. jan/mar; 17\(1\):96-101/pdf](http://www.Google.com.br/Rev.enferm.UERJ.jan/mar;17(1):96-101/pdf). Acessado a 04 de Março de 2010.



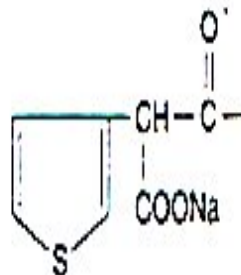
16. OLIVEIRA, *et al.* *Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from hospitals throughout.* Brazilian Journal of Infectious Diseases. Brazil, 2001. p.163-70.
17. PEREIRA, Alexandre. *SPSS: guia prático de utilização.* 6ª edição. Edições sílabo, Lda. Lisboa, 2006
18. PEREIRA, M. S. V. *Staphylococcus aureus: o microvilão da resistência a antibióticos.* João Pessoa - Paraíba, 2002.
19. POCINHO, Margarida & FIGUEREIRO, João Paulo. *Estatística e Bioestatística.* Brasil, 2004.
20. RIBEIRO, Isabel e CASTANHEIRA, Rui. *Tratamento e prevenção das infeções e da colonização por Staphylococcus aureus.* In Rev Port Pneumol IX (5): 395-409. Porto, 2003.
21. TRABULSI, Luiz & ALTERTHUM, Flávio. *Microbiologia.* 4ª edição—revista e actualizada. Editora Atheneu. São Paulo, 2008. p.182.
22. TRABULSI, Luiz & ALTERTHUM, Flávio. *Microbiologia.* 5ª Edição. Editora Atheneu. São Paulo, 2008. p.182.
23. WRIGHT, A. V. *Regulation the Saft of probiotcs: The European approach.* *Current Pharmaceutical Desing.* vol.11. USA, 2005. p. 17-23.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 - Estruturas do PABA, Sulfonamidas e da Ticarcilina



**Figura 1.** Estruturas do PABA e Sulfonamidas, respectivamente (JAWETZ, 2009).



**Figura 2.** Estrutura da Ticarcilina, uma penicilina semi-sintética (JAWETZ, 2009).

## ANEXO 2 - Estrutura de algumas Tetraciclina

	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Depuração renal (m <sup>l</sup> /min)
Tetraciclina	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	65
Doxiciclina	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	16
Minociclina	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-H	< 10

### Atividade antimicrobiana

Figura 3. Estrutura de algumas tetraciclina (JAWETZ, 2009).

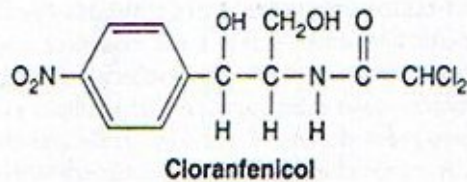


Figura 4. Estrutura do Cloranfenicol (JAWETZ, 2009).

**ANEXO 3 – Cruzamento das variáveis Resistência à Meticilina e produção de  $\beta$ -lactamase**

**Tabela 2:** Relação entre resistência e sensibilidade à metilina e produção de  $\beta$ -lactamase.

			Beta-Lactamase		Total
			-	+	
<b>M</b>	<b>R</b>	Count	3	35	38
		% within M	7.90%	92.10%	100.00%
		% within Beta-Lactamase	23.10%	94.60%	76.00%
<b>S</b>		Count	10	2	12
		% within M	83.30%	16.70%	100.00%
		% within Beta-Lactamase	76.90%	5.40%	24.00%
<b>Total</b>		Count	13	37	50
		% within M	26.00%	74.00%	100.00%
		% within Beta-Lactamase	100.00%	100.00%	100.00%

**Tabela 3:** valor de qui-quadrado obtido pelo *Chi-Square Tests* no SPSS software

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	26.976 <sup>a</sup>	1	.000		
Continuity Correction <sup>b</sup>	23.198	1	.000		
Likelihood Ratio	25.502	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
N of Valid Cases	50				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.12.

b. Computed only for a 2x2 table

# APÊNDICES

## APÊNDICE A - Observação da Hemólise



**Figura 5.** Observação da Hemólise (halo ao redor das colónias) em meio ágar sangue humano (Foto do autor).

## APÊNDICE B - Fermentação do Manitol



**Figura 6.** Fermentação do Manitol, meio MS normal (a esquerda), meio MS fermentado, muda de cor para amarelo – ação de *Staphylococcus aureus* (Foto do autor).



## APÊNDICE C - Prova de $\beta$ -lactamase



**Figura 7.** Prova de  $\beta$ -lactamase. O círculo vermelho destaca a área que muda de cor após inoculação da bactéria (resultado positivo) (Foto do autor).

## APÊNDICE D - passos para realização do T.S.A



**Figura 8.** Padronização do inóculo, baseada na escala 0,5 de Mc Farland (Foto do autor).

**APÊNDICE D1 - passos para realização do T.S.A**



**Figura 9.** Retirada do inóculo para semeadura na placa (Foto do autor).

**APÊNDICE D2 - passos para realização do T.S.A**



**Figura 10.** Plaqueamento do inóculo (Foto do autor).

### APÊNDICE D3 - passos para realização do T.S.A



**Figura 11.** Ilustração do plaqueamento do inóculo (Foto do autor).



APÊNDICE D4 - passos para realização do T.S.A



Fig.12. Medição dos halos de inibição (Foto do autor).

## Índice

	<b>Página</b>
Lista de tabelas e gráficos.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de siglas e abreviaturas .....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos .....	vi
Declaração de honra.....	vii
Resumo .....	viii
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1. Problema.....	11
1.2. Justificativa.....	11
1.3. Objectivos da pesquisa .....	12
1.3.1. Objectivo geral .....	12
1.3.2. Objectivos específicos .....	12
1.4. Questões e Hipóteses.....	12
1.4.1. Questões.....	12
1.4.2. Hipóteses .....	13
<b>CAPÍTULO II – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>14</b>
2.1. Características dos estafilococos.....	14
2.2. Patogenia e imunidade dos estafilococos.....	14
2.2.1. Toxinas estafilocócicas.....	14
2.2.2. Enzimas estafilocócicas.....	15
2.3. Cultura de estafilococos .....	16
2.4. Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antibióticos .....	16
2.4.1. <i>S. aureus</i> resistente à Penicilina .....	17

2.4.2. <i>S. aureus</i> resistente à Oxacilina (ORSA): situação actual.....	17
2.5. Modos de acção dos antimicrobianos.....	18
2.5.1. Actividade dos $\beta$ -lactâmicos em bactérias gram-positivas.....	19
2.5.2. Interferência na membrana citoplasmática.....	19
2.5.3. Interferência da síntese de proteínas mediante a ligação a subunidade ribossómica 30S.....	19
2.5.4. Inibição da síntese de proteínas mediante a subunidade ribossómica 50S.....	20
CAPÍTULO III - METODOLOGIA.....	21
3.1. Área de estudo.....	21
3.2. Natureza do estudo.....	22
3.3. Amostragem e amostra.....	22
3.4. Fontes de material biológico.....	23
3.5. Identificação e isolamento das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
3.6. Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA).....	24
3.6.1. Selecção das Colónias.....	24
3.6.2 Preparação e padronização da suspensão de inóculo.....	25
3.6.3. Preparação para a inoculação na placa.....	25
3.6.4 Inoculação na placa.....	26
3.6.5. Aplicação dos discos de Antibióticos.....	26
3.6.6. Incubação das placas.....	26
3.6.7. Medição das zonas de inibição.....	27
3.7. Verificação da produção de $\beta$ -lactamase.....	27
3.8. Variáveis de estudo.....	27
3.9. Análise de dados.....	28
CAPÍTULO IV- ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	29
4.1. Apresentação de resultados.....	29



4.1.1. Leitura do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (T.S.A) .....	29
4.1.2. Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em função da natureza da amostra .....	30
4.1.3. Prova de $\beta$ -lactamase .....	31
4.1.4. Relação Resistência à Meticilina e produção de $\beta$ -Lactamase .....	32
4.2. Discussão dos resultados .....	34
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	38
5.1. Conclusões .....	38
5.2. Recomendações .....	39
CAPÍTULO VI - BIBLIOGRAFIA .....	40
ANEXOS	
APÊNDICES	

Marcos Enfraime Pedro André

**Avaliação da Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes em amostras clínicas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo**

Licenciatura em Ensino de Biologia

Universidade Pedagógica  
Maputo  
2010

Marcos Enfraime Pedro André

**Avaliação da Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes em amostras clínicas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo**

Licenciatura em Ensino de Biologia

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia na Faculdade de Ciências Naturais e Matemática para obtenção do grau de Licenciatura em Ensino de Biologia.

Supervisores:

dr. Juvêncio Manuel Nota

Dra Oraima Escandell Garcia

Universidade Pedagógica

Maputo

2010