

Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo

Ângela Rita Vieira Fernandes

Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética

Departamento de Biologia e Departamento de Química e Bioquímica

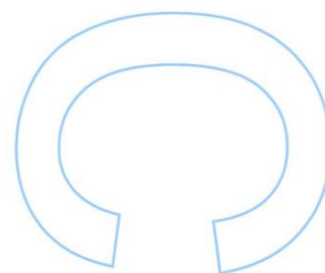
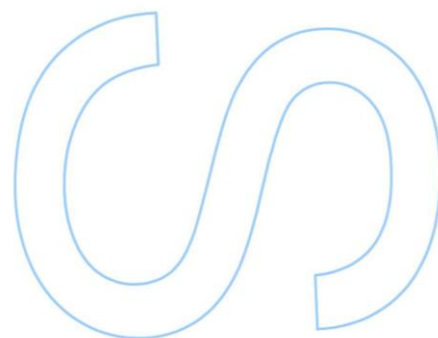
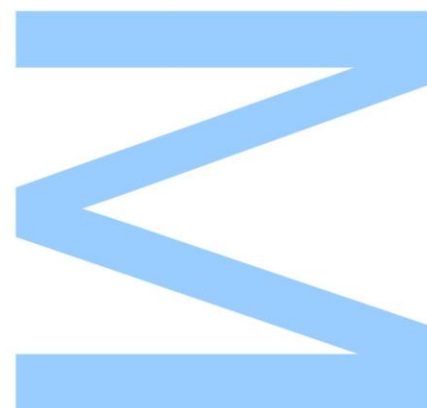
2021

Orientador

Cidália Pina-Vaz, CEO da FASTinov e Professora Associada na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Coorientador

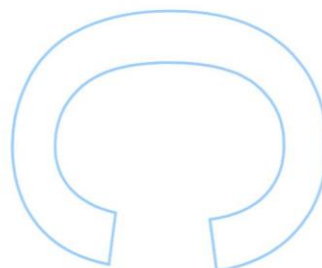
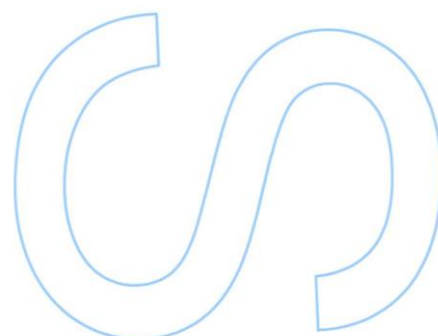
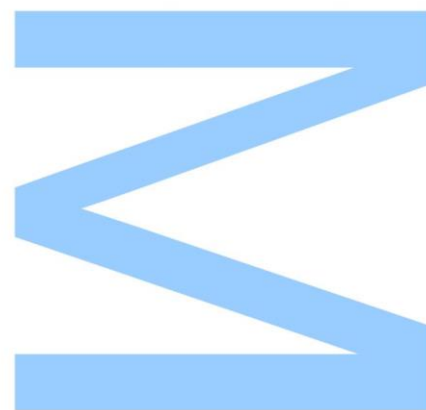
Conceição Santos, Professora Catedrática, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo” Fernando Pessoa

À minha orientadora, Professora Doutora Cidália Pina Vaz, por todo o apoio prestado, pela oportunidade e disponibilidade de me acolher na FASTinov, e por me incentivar na Microbiologia já desde os tempos da minha licenciatura.

À minha coorientadora, Professora Doutora Conceição Santos, pela disponibilidade de responder aos meus tantos e-mails e por ter sempre uma palavra de apreço e incentivo.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em especial aos docentes que me acompanharam nos meus breves anos pelo Campo Alegre, por me proporcionarem uma formação académica de qualidade e excelência. Sem dúvida que levo boas aprendizagens que me ajudarão no meu futuro profissional.

À Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, com um carinho pelo Serviço e Laboratório de Microbiologia, por me acolherem tão bem e me permitirem desenvolver as minhas competências laboratoriais. Em especial, um agradecimento ao Professor Doutor Acácio Rodrigues por acreditar no meu potencial. À Doutora Elisabete Ricardo por me acompanhar e pela sua disponibilidade para todas as minhas dúvidas. À Isabel Santos por sempre se mostrar preocupada e atenta ao que necessito. Ao Doutor Luís Cobrado e à Doutora Patrícia Ramalho por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver o meu conhecimento no projeto.

Aos meus amigos, que mesmo nas adversidades me ajudaram e aturaram os meus devaneios, e por eles que sabem que “só faz falta quem cá está”. Em especial, à Maria e à Rita por celebrarem comigo todas as pequenas conquistas.

Às minhas colegas de casa, com as quais partilho as conquistas e derrotas diárias e se tornaram amigas especiais. À Bia, futura “Médica Dentária” e à Vanessa, quem sabe uma locutora de rádio.

À minha família, que mesmo a uns quilómetros de distância, sempre se mostraram presentes e tentaram entender tudo o que eu fazia no laboratório. Mas principalmente, por acreditarem em mim e confiarem nas minhas decisões.

Resumo

Um Estágio Curricular em Contexto Empresarial surge como uma oportunidade de aplicação do conhecimento adquirido durante o percurso académico e como preparação para a entrada na vida profissional. Na área da biotecnologia, a aplicação de conhecimentos científicos na indústria é vasta. Neste relatório está descrito o trabalho realizado no âmbito da biotecnologia aplicada à saúde.

A resistência aos antimicrobianos é um dos problemas contemporâneos mais graves. Custos hospitalares elevados, mortalidade e falha terapêutica dos antibióticos são algumas das consequências desse impacto. A necessidade de testes de avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos levou ao estudo da aplicação da citometria de fluxo na microbiologia clínica, pela FASTinov®. No seguimento do desenvolvimento desta tecnologia, surge a possibilidade de aplicação desta metodologia no doseamento de antibióticos. O doseamento de antibióticos por métodos microbiológicos será capaz de, em tempo útil, determinar uma terapêutica personalizada e mais rigorosa, reduzindo os riscos quer de insucesso por escassez de fármaco disponível quer de toxicidade por excesso. Através da citometria de fluxo, uma técnica em expansão na área da microbiologia, foi possível realizar uma prova de conceito do doseamento microbiológico de colistina utilizando soro de doentes hospitalizados.

A par do estudo de aplicações biotecnológicas na prevenção de infeções e da emergência de resistências aos antimicrobianos, surge a minha integração num outro projeto “Impacto da nebulização seca de H_2O_2/Ag^+ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados”, a decorrer no serviço e laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. A transmissão microbiológica em unidades de cuidados intensivos é responsável pelo aumento das infeções e pelo desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos. Assim sendo, a desinfeção eficiente destes locais torna-se fundamental. O Peróxido de Hidrogénio é atualmente utilizado em casos isolados, todavia o processo de desinfeção é demorado. Neste projeto é estudada a implementação de um ciclo mais rápido. Nos ensaios descritos relativos ao estudo da quantificação celular em biofilmes e viabilidade, por Cristal Violeta (CV) e 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida; XTT), os resultados isoladamente não possuem significância estatística. Não se verificou efeito indutor de resistência por este biocida em leveduras até ao 60º dia e em bactérias até ao 20º dia (ainda em

desenvolvimento). No estudo em ambiente hospitalar de recolha de isolados ambientais, o local com carga bacteriana mais elevada é o quarto antes de ser realizada qualquer tipo de limpeza. Por outro lado, após a desinfeção com H_2O_2 vaporizado a carga bacteriana é ínfima.

Palavras-chave: Resistência aos antimicrobianos, Doseamento de antibióticos, Citometria de fluxo, Desinfeção, Ambiente hospitalar, Infecções associadas aos cuidados de saúde, Aplicações biotecnológicas

Abstract

A curricular internship in industry context is an opportunity to apply the knowledge acquired during academic path and as a preparation for entry into professional life. In the field of biotechnology, the application of scientific knowledge in the industry is vast. This report describes the work carried out in the field of biotechnology applied to health.

Antimicrobial resistance is one of the most serious contemporary problems. High hospital costs, mortality and therapeutic failure of antibiotics are some of the consequences of this impact. The need for antimicrobial susceptibility assessment tests led to the study of the application of flow cytometry in clinical microbiology by FASTinov®. Following the development of this technology, the possibility of applying this methodology in the dosing of antibiotics arises. The dosing of antibiotics by microbiological methods will be able, in a timely manner, to determine a personalized and more rigorous therapy, reducing the risks of both failure due to shortage of available drug or excess causing toxicity. Through flow cytometry, an expanding technique in microbiology, it was possible to perform a proof of concept of microbiological dosing of colistin using serum from hospitalized patients.

In addition to the study of biotechnological applications in the prevention of infections and the emergence of antimicrobial resistance, my integration into another project "Impact of dry nebulization of H_2O_2/Ag^+ on infection associated with health care: the paradigm of the Burn Unit", taking place in the service and microbiology laboratory of the Faculty of Medicine of the University of Porto. Microbiological transmission in intensive care units is responsible for the increase in infections and the development of antimicrobial resistance. Therefore, efficient disinfection of these sites becomes essential. Hydrogen Peroxide is currently used in isolated cases; however, the disinfection process is time consuming. In this project is studied the implementation of a faster cycle. In the described trials related to the study of cell quantification in biofilms and viability, by violet crystal and 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide; XTT), the results alone have no statistical significance. There was no resistance-inducing effect by this biocide in yeasts until the 60th day and in bacteria until the 20th day (still in development). In the study in a hospital environment of collection of environmental isolates, the local with the highest bacterial load is the bedroom before any type of cleaning is performed. On the other hand, after disinfection with vaporized H_2O_2 the bacterial load is minimum.

Keywords: Antimicrobial resistance, Antimicrobial Dosing, Flow cytometry, Desinfection, Hospital environment, Infections associated with health care, Biotechnological applications

Índice

Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Introdução	1
Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo	3
1. Enquadramento: FASTinov.....	3
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Problemática da resistência aos antimicrobianos	4
2.1.1. Resistência aos antimicrobianos e a COVID-19.....	6
2.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos – métodos clássicos	6
2.3. Citometria de fluxo.....	9
2.4. Doseamento de antimicrobianos.....	11
2.5. Colistina (Polimixina E).....	13
3. Objetivos	14
4. Metodologia.....	15
4.1. Estirpe utilizada	15
4.2. Preparação da solução stock de antimicrobiano.....	15
4.3. Protocolo de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana pelo método clássico - microdiluição.....	15
4.4. Protocolo citométrico	16
4.4.1. Preparação de antimicrobianos, reagentes e placas	16
4.4.2. Obtenção da suspensão bacteriana.....	17
4.4.3. Aplicação/Otimização do protocolo citométrico para o doseamento ...	17
5. Resultados	17
5.1. Protocolo de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana pelo método clássico - microdiluição.....	17
5.2. Protocolo de doseamento microbiológico	17
6. Discussão.....	18
Impacto da nebulização seca de H₂O₂/Ag⁺ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados.....	23
1. Enquadramento: Serviço e laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto	23
2. Revisão bibliográfica.....	23

2.1.	Transmissão microbiológica em unidades de cuidados intensivos.....	23
2.2.	Peróxido de hidrogénio.....	25
3.	Objetivos	26
4.	Metodologia.....	27
4.1.	Efeito antimicrobiano do H ₂ O ₂ na desinfeção de superfícies colonizadas com biofilmes	27
4.2.	Indução de resistência do H ₂ O ₂	29
4.3.	Análise quantitativa e qualitativa de isolados ambientais durante o ciclo de limpeza e desinfeção	30
5.	Resultados	32
5.1.	Efeito antimicrobiano do H ₂ O ₂ na desinfeção de superfícies colonizadas com biofilmes	32
5.2.	Indução de resistência do H ₂ O ₂	33
5.3.	Análise quantitativa e qualitativa de isolados ambientais durante o ciclo de limpeza e desinfeção	37
6.	Discussão	44
	Rotina em laboratório de microbiologia.....	51
	Conclusão	52
	Referências Bibliográficas	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 - <i>Breakpoints</i> de <i>Enterobacterales</i> para a colistina, de acordo com o CLSI.	15
Tabela 2 - Avaliação da suscetibilidade da estirpe à colistina, por microdiluição.	17
Tabela 3 - Descrição das estirpes utilizadas.	27
Tabela 4 - Condições controlo do ensaio.	28
Tabela 5 - Pontos de recolha de isolados ambientais na UQ.	31
Tabela 6 - Estudo de quantificação celular de <i>A. baumannii</i> , pelo teste de CV.	32
Tabela 7 - Estudo de viabilidade celular da <i>K. pneumoniae</i> , pelo ensaio de XTT.	33
Tabela 8 - Informação relativa às leveduras em estudo.	33
Tabela 9 - Informação relativa às bactérias em estudo.	34
Tabela 10 - Determinação da MIC ao H ₂ O ₂ nos dias 0, 30 e 60, para leveduras.	34
Tabela 11 - Determinação da MIC ao H ₂ O ₂ nos dias 0 e 20 para bactérias.	35

Lista de Figuras

Figura 1 - Metodologia patenteada pela FASTinov ®. Adaptado de: www.fastinov.com	3
Figura 2 - Tríade de interação hospedeiro - microrganismo - antibiótico em caso de infecção. Adaptado de: Asín-Preto et al., 2015.	12
Figura 3 - Painel de disposição das placas para o doseamento microbiológico.	16
Figura 4 - Distribuição de fluorescência apresentada pela amostra controlo.	18
Figura 5 - Distribuição de fluorescência da amostra com marcação pelo IP.	18
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo a aplicar.	20
Figura 7 - Alterações macroscópicas causadas pela ação sistemática do H ₂ O ₂	36
Figura 8 - Análise global de CFU da recolha-exemplo. a) Percentagem de CFUs encontradas em cada espaço, por CFUs totais; b) Percentagem de CFUs por espaço e de acordo com o estado de limpeza.	37
Figura 9 - Distinção das bactérias encontradas de acordo com a coloração de Gram.	38
Figura 10 - Espécies de <i>Staphylococcus spp.</i> encontradas.	38
Figura 11 - Percentagem de CFUs encontradas no quarto de acordo com o estado de limpeza.	38
Figura 12 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no quarto. a) Sujo; b) Limpo.	39
Figura 13 - Percentagem de CFUs encontradas na sala de balneoterapia de acordo com o estado de limpeza.	39
Figura 14 - Microrganismos encontrados, em CFUs, na sala de balneoterapia. a) Sujo; b) Limpo.	39
Figura 15 - Percentagem de CFUs encontradas no bloco operatório de acordo com o estado de limpeza.	40
Figura 16 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no bloco operatório. a) Sujo; b) Limpo; c) Desinfetado.	40
Figura 17 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha do quarto.	41
Figura 18 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha da sala de balneoterapia.	41
Figura 19 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha do bloco operatório.	42
Figura 20 - Percentagem de CFUs recolhidas do ar em cada espaço, por CFUs totais do ar.	42
Figura 21 - Percentagem de CFUs encontradas no ar do quarto de acordo com o estado de limpeza.	43
Figura 22 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no ar do quarto. a) Sujo; b) Limpo.	43

Figura 23 - Percentagem de CFUs encontradas no bloco operatório de acordo com o estado de limpeza.....	43
Figura 24 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no ar do bloco operatório, após a limpeza manual.....	43

Lista de Abreviaturas

BH	Meio de cultura <i>Brain-Heart Infusion</i>
CFU	Unidade Formadora de Colónia
CHUSJ	Centro Hospitalar Universitário S. João
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CM	Ciclo mini de desinfeção com H ₂ O ₂
CMS	Metassulfonato de colistina
CN	Ciclo normal de desinfeção com H ₂ O ₂
CV	Cristal Violeta
DG18	Meio de cultura de diclorano glicerol
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FCM	Citometria de Fluxo
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
FMUP	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
I	Fenótipo Intermédio
IACS	Infeção Associada aos Cuidados de Saúde
IP	Iodeto de Propídeo
LB	Meio de cultura <i>Luria-Bertani</i>
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa de Dessorção/Ionização Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo
MHL	Meio de cultura <i>Mueller-Hinton</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória
ODS	Objetivo de desenvolvimento sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PD	Farmacodinâmica
PK	Farmacocinética
R	Fenótipo Resistente
S	Fenótipo Suscetível
SAB	Meio de cultura <i>Sabourad Dextrose Agar</i>
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UQ	Unidade de Queimados
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)
YPD	Meio de cultura composto por extrato de levedura, peptona e dextrose

Introdução

No âmbito da unidade curricular Estágio Curricular em Contexto Empresarial surge o desenvolvimento deste relatório com o tema “Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo”, para a obtenção do grau de Mestre em Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2010), “A biotecnologia é a integração das novas técnicas emergentes da biotecnologia moderna com as abordagens bem estabelecidas da biotecnologia tradicional. É um conjunto de técnicas capazes de criar produtos específicos desenvolvidos pelo Homem no DNA, ou material genético, em plantas, animais e sistemas microbianos, levando a produtos e tecnologias úteis.”

A biotecnologia subdivide-se em diferentes áreas, sendo uma delas a biotecnologia medicinal, que tem como objetivo a melhoria da saúde humana e animal e envolve desde métodos terapêuticos, como fármacos, tecnologias de diagnóstico, como biossensores, e metodologias de prevenção, como as vacinas. Neste relatório, está subjacente esta área promissora da biotecnologia.

O estágio curricular em contexto empresarial tem como mote a promoção do contacto dos estudantes com a realidade empresarial e profissional, tornando possível a consolidação, aplicação e desenvolvimento de conhecimento adquiridos ao longo do percurso académico.

No âmbito dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) concebidos pela ONU [1], fazem-se notar os seguintes objetivos. O ODS 3 - Saúde de Qualidade, em que através da investigação científica desenvolvida no âmbito do combate à resistência aos antimicrobianos, será possível combater doenças transmissíveis, como descrito no objetivo, e também promover a literacia para o tema. O ODS 4 - Educação de Qualidade, que me permitiu ter acesso à educação de qualidade providenciada pela FCUP e que me possibilitou a realização deste estágio. Por fim, o ODS 9 - Indústria, Inovação e Infraestruturas, que promove a investigação científica e fomenta a inovação através dos financiamentos dos projetos em que me envolvi.

Em paralelo com o desenvolvimento da prova de conceito do doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo, participei num projeto em execução no serviço e laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) - “Impacto da nebulização seca de H_2O_2/Ag^+ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados”. Assim, no âmbito do desenvolvimento de aplicações biotecnológicas na prevenção de infeções e das resistências aos antimicrobianos, surge um capítulo com a descrição da minha participação no mesmo.

O relatório encontra-se dividido em capítulos. No primeiro capítulo pode ler-se a introdução da envolvente do estágio. No segundo e terceiro capítulos encontram-se descritos os projetos/aplicações desenvolvidas no período de estágio: “Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo” e “Impacto da nebulização seca de H_2O_2/Ag^+ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados”, respetivamente. No quarto capítulo refere-se brevemente outro trabalho suplementar desenvolvido na rotina laboratorial na qual estava inserida. No quinto e último capítulo encontra-se a conclusão do relatório.

Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo

1. Enquadramento: FASTinov

A FASTinov ® é uma empresa *start-up* focada no desenvolvimento de metodologias para rápida avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias, por citometria de fluxo. Com esta metodologia é possível diminuir o tempo necessário da determinação da suscetibilidade da bactéria para o antimicrobiano para 2 horas, comparativamente às 48 horas dos métodos clássicos (Figura 1) [2].

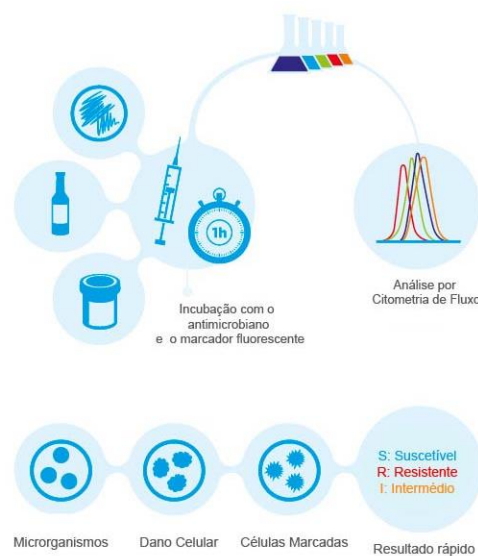


Figura 1 - Metodologia patenteada pela FASTinov ®. Adaptado de: www.fastinov.com

Além da redução da emergência das resistências aos antimicrobianos, esta metodologia tem ainda impacto positivo na redução da mortalidade e morbilidade e na redução dos custos hospitalares, contribuindo assim para a melhoria dos serviços de saúde. As suas vantagens incluem a rapidez de diagnóstico conseguida através da utilização direta de amostras biológicas, e análise de uma grande variedade de microrganismos e antimicrobianos, permitindo até a identificação dos principais mecanismos de resistência [2].

2. Revisão bibliográfica

2.1. Problemática da resistência aos antimicrobianos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde [3], os antimicrobianos, que incluem antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários, atuam no tratamento de infeções causadas por microrganismos patogénicos. No caso dos antibióticos, a resistência corresponde à alteração genética da estirpe bacteriana na resposta ao fármaco devido ao desenvolvimento de mecanismos moleculares que lhe permitir resistir aos efeitos bactericida ou bacteriostático, aos quais anteriormente era suscetível [4–6]. Quando as bactérias resistentes infetam um organismo, o resultado é uma infeção mais grave e menos controlável [6].

A resistência aos antibióticos é um fator crucial na dinâmica clínica e económica do hospital. Assim que o tratamento por um determinado antibiótico falha, dá-se o desenvolvimento de mecanismos de resistência e, consequentemente, o aumento do custo do tratamento devido à necessidade de utilização de uma nova classe de antibióticos, usualmente mais cara. De salientar ainda o impacto nefasto no meio ambiente e na saúde pública [7]. Quando se esgota a primeira linha de tratamento, a seguinte será mais limitada e os antibióticos serão mais tóxicos. Mesmo sendo um tratamento efetivo acarreta mais custos hospitalares, recuperação mais longa e possibilidade de perda de eficácia a longo prazo [8].

A terapia empírica corresponde à prescrição de antibiótico sem consulta de testes de microbiológicos [9] e apesar da aplicação desta estratégia, durante a primeira hora, na suspeita de sepsia, diminuir os níveis de mortalidade; apresenta desvantagens como efeitos secundários, alteração do microbioma, facilitação de infeções oportunistas e aumento das resistências [10].

Em ambiente hospitalar, em que se verifica uma elevada afluência de doentes imunossuprimidos e um crescendo em métodos invasivos, verifica-se o aumento da vulnerabilidade dos doentes. Este problema toma maiores proporções devido ao sério risco de infeções causadas por bactérias multirresistentes. Uma simples cirurgia pode resultar na infeção por estas bactérias e não haverá terapêutica antimicrobiana disponível. A nível mundial, em 2016, a mortalidade atingiu valores de 700 mil mortes anuais e estima-se que, em 2050, atinja valores de 10 milhões por ano [11].

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida, envolvendo quatro categorias: inativação enzimática do antibiótico, diminuição da permeabilidade da parede celular, efluxo do antibiótico e alteração dos locais de ligação do fármaco. A resistência intrínseca é específica ao organismo. Por outro lado, a resistência adquirida advém de mutações ou de genes mutados (por transformação, transdução ou conjugação) [12]. Este fenómeno é consequência da seleção natural e das mutações genéticas [4]. Após a aquisição da resistência, as bactérias modificadas competem com as bactérias sensíveis; sendo que as resistentes sobrevivem e multiplicam-se. Pode ainda ocorrer transferência horizontal, mecanismo pelo qual ocorre transferência de material genético entre células não descendentes (independente da reprodução), permitindo a propagação de resistências entre diferentes espécies [8].

A utilização exacerbada dos antibióticos pelo uso inadequado nos sistemas de saúde, na agricultura e gastronomia permitiu às bactérias evoluir e desenvolver os seus mecanismos de resistência [13]. Na agricultura e pecuária, os antibióticos são utilizados na melhoria da saúde animal, e na produção e qualidade dos produtos, permitindo o desenvolvimento de resistências. Neste sentido, os alimentos vão conter as bactérias resistentes, que serão selecionadas, podendo causar infeções no organismo humano. Além disso, este tipo de alterações afeta a microbiota ambiental [8].

Anteriormente, a estratégia da indústria farmacêutica passava pela produção de antibióticos capazes de combater as bactérias resistentes; no entanto, atualmente, enfrenta obstáculos económicos e de regulação. O desenvolvimento de antibióticos tornou-se num investimento com pouco retorno, porque são usados por curtos períodos de tempo e têm efeito curativo num curto período de tempo, contrariamente aos fármacos utilizados nas doenças crónicas, em que a sua administração se prolonga com o tempo. Além disso, após a sua inovação/produção de um novo antibiótico, normalmente, é mantido para situações de emergência; ou seja, é considerado a “última linha”, logo com pouco volume de venda. Acresce a estas dificuldades, a complexidade na aprovação dos novos fármacos com burocracia, falta de clareza, variações entre países nos estudos clínicos e alterações na regulamentação [8].

2.1.1. Resistência aos antimicrobianos e a COVID-19

A COVID-19 deve-se à infeção pelo vírus SARS-CoV-2. Esta pandemia foi responsável por milhões de mortes e causou uma incerteza social e económica. Devido à magnitude da pandemia, seria expectável que afetaria as outras valências da saúde, como o caso da resistência aos antimicrobianos [14].

Em janeiro de 2020, num estudo realizado na China relativo a infeções em adultos associadas à COVID-19, apenas se verificou que 1% com co-infeções bacterianas; ainda assim, foram administrados antibióticos a 71% dos doentes diagnosticados com COVID-19. Esta terapêutica deveu-se aos relatos iniciais relativos à infeção viral e a sua relação com co-infeção. As bactérias mais frequentemente isoladas nestes casos foram: *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* [15].

Os doentes com infeções respiratórias virais, devido à diminuição da resposta imune, estão mais predispostos a sofrer de infeções bacterianas (fator de risco) [16]. Por outro lado, noutras emergências de SARS-CoV foi possível identificar a transmissão rápida de infeção entre doentes com bactérias resistentes [15]. Durante a pandemia de SARS-CoV-2, o antibiótico azitromicina foi o segundo tratamento mais prescrito [16].

A pandemia de COVID-19 resultou na prescrição indiscriminada de antibióticos. Este facto, contradiz as estratégias a aplicar para reduzir a emergência de resistência aos antibióticos - a criação de diretrizes sobre escolha do antibiótico, dosagem e a duração da prescrição [15].

Adicionalmente, a desinfecção constante de superfícies e mãos suscitada pela pandemia possibilitou o desenvolvimento de uma pressão seletiva para seleção de bactérias resistentes e ainda a alteração da microbiota da pele. Neste seguimento, o uso indiscriminado de antibióticos terá a mesma consequência, devido ao incumprimento das diretrizes de prescrição dos mesmos [16].

2.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos – métodos clássicos

Para determinar a possível resistência de um microrganismo utilizam-se testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), pois avaliam a facilidade de um agente antimicrobiano em inibir o crescimento bacteriano *in vitro* [17]. São essenciais a

rapidez e a previsão confiável dos resultados; no entanto, as principais limitações passam pela necessidade de grandes quantidades de organismos viáveis, o processamento pré-analítico complicado, o espectro limitado de organismos, e o tempo e o custo inerente [18].

O *breakpoint* (ou ponto de corte) corresponde à concentração de antibiótico, em µg/mL, que distingue os microrganismos com fenótipo suscetível (S), intermédio (I) ou resistente (R) [13]. É determinado pelas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antibiótico de acordo com o efeito no doente.

No entanto, com a evolução das resistências, estes valores podem-se alterar [19]. Assim as entidades reguladoras publicam periodicamente estes valores, que vão sofrendo alterações, dificultando o desenvolvimento de novos métodos. Na Europa, a entidade responsável denomina-se de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test* (EUCAST) e nos Estados Unidos da América, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Os métodos baseados na cultura dos microrganismos são avaliados pela deteção do fenótipo de suscetibilidade perante o crescimento bacteriano na presença de antibiótico [20]. Sendo os mais comuns, a microdiluição em caldo, teste de difusão em disco e *E-test*.

A microdiluição em caldo é o método quantitativo padrão que permite o teste de diferentes fármacos/microrganismos simultaneamente, já que se realiza em microplacas de 96 poços [20]. Preparam-se diluições 1:2 seriadas do fármaco a testar e inoculam-se com o microrganismo no meio de cultura recomendado [21] seguido de incubação durante 18 a 20 horas, numa estufa a 35 ± 2 °C. Posteriormente, efetua-se a leitura visual do crescimento da cultura bacteriana [22]. O crescimento do microrganismo é confirmado por formação de turvação nos poços e permite a determinação da concentração mínima inibitória (em inglês, *minimum inhibitory concentration* – MIC). As MICs também são usadas para registo de dados epidemiológicos e permitem acompanhar a evolução das resistências; além disso são também usadas para determinar os fenótipos de suscetibilidade e a eficácia de novos antibióticos [13]. Esta técnica permite a obtenção de resultados fiáveis, reproduzíveis e quantitativos. Por outro lado, é um método moroso, logo de difícil realização na rotina laboratorial [21].

No teste de difusão em disco, os discos de papel impregnados com concentrações fixas de antibiótico são dispostos em meio de cultura sólido, que é previamente inoculado homogeneamente com o microrganismo. O antibiótico irá difundir e, após incubação, haverá a formação de um halo (zona sem crescimento) correspondente ao fenótipo de suscetibilidade da bactéria ao fármaco [17,20]. As vantagens deste teste são a sua simplicidade, equipamento simples, resultados fáceis de interpretar e flexibilidade de escolha de fármacos. No entanto, há falta de automação [21]; sendo que os resultados são somente qualitativos e demoram 24 horas a ser obtidos.

O *E-test* (bioMérieux AB BIODISK) é capaz de determinar o fenótipo de suscetibilidade e a MIC. Baseia-se na criação de um gradiente de concentrações de antimicrobiano para determinar a suscetibilidade. Assim, há impregnação de uma tira de papel com o referido gradiente que será disposta em meio de cultura recém-inoculado. As placas são colocadas na estufa durante 18 a 24 horas e posteriormente realiza-se a leitura da MIC, correspondente à interseção da tira com a elipse/halo formada pelo crescimento bacteriano [13].

Os métodos automáticos mais utilizados nos laboratórios são: Vitek (BioMérieux), MicroScan WalkAway (Beckman Coulter) e Phoenix (BD). Baseiam-se no mesmo princípio dos métodos manuais e demoram entre 8 a 25 horas. Os métodos moleculares e, mais recentemente, a técnica de espectrometria de massa de dessorção/ionização assistida por matriz como analisador por tempo de voo (MALDI-TOF), conseguem rapidamente (1 a 2 horas) detetar genes e proteínas que conferem resistência, contudo não são conhecidos todos os mecanismos de resistência e nada inferem acerca da suscetibilidade [23].

Assim, os novos métodos englobam vários tipos de complexidade, gama de preço, rapidez e eficácia de identificação. De salientar que os testes de diagnóstico têm de ser clinicamente relevantes, por assim dizer devem ajudar na prevenção e tratamento de doenças. Mas é necessário ter em conta: reprodutibilidade, repetibilidade, rapidez e razão custo-benefício.

Recentemente, através do estudo das lesões causadas à morfologia das células pelos antimicrobianos foi possível determinar a suscetibilidade sem a necessidade de crescimento bacteriano prolongado, por citometria de fluxo [24].

2.3. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (FCM) é capaz de analisar parâmetros físicas e químicos de células marcadas com fluorocromos, assim que elas atravessam rapidamente um feixe laser. A dispersão da luz é detetada e convertida em informação digital/gráfica. É possível determinar o tamanho e a forma das células, e quantificar os biomarcadores aplicados nos constituintes celulares [25].

Para analisar a amostra, as células são suspensas numa solução, que, posteriormente, transpõe um filtro estreito onde as células convergem hidrodinamicamente para o centro da corrente. De seguida atravessam o feixe laser e, nesse momento, a luz é dispersa em todas as direções. Por fim, é recolhida a informação relativa à dispersão da luz, convertida em sinal eletrónico e organizada num histograma [25].

O citometro de fluxo é composto maioritariamente por três sistemas: de fluídos, ótico e eletrónico. O sistema de fluídos permite a formação de uma corrente de fluxo celular que atravessa o feixe laser. O movimento é conseguido por um líquido circulante (*sheat fluid*). O sistema ótico é composto pela fonte de luz laser, que irá intercepar cada célula individualmente. A partícula emitirá fluorescência em todos os ângulos, ou seja, irá dispersar-se. A dispersão frontal da luz (em inglês, *foward light scatter*) indica o tamanho da célula e a dispersão lateral da luz (em inglês, *side scatter*) corresponde grosseiramente à complexidade da mesma. No sistema eletrónico, os tubos fotomultiplicadores recolhem os fótons e amplificam o sinal, que é convertido em voltagem e, consequentemente, em sinal analógico [26].

A fluorescência ocorre quando o feixe laser atravessa a partícula levando à fluorescência do fluorocromo. Nesse momento, dá-se a excitação das moléculas pela luz do comprimento de onda do laser [25]. Na sensibilidade da fluorescência há dois aspetos a ter em conta: limite de deteção e resolução. O limite de deteção corresponde à menor quantidade que é passível de ser detetada. A resolução corresponde à capacidade de distinção entre células marcadas e não marcadas. A sensibilidade da dispersão da luz é ditada pelo grau em que as partículas/células são detetadas em detrimento das partículas constituintes da suspensão. A dispersão lateral é afetada pelo líquido circulante e a dispersão frontal pela fonte de excitação [27].

Os fluorocromos utilizados podem estar ligados a anticorpos (coloração indireta) ou a estruturas celulares (coloração direta) [25]. Para a caracterização de terapias com antimicrobianos, os reagentes atuam por detecção da variação da isotonia celular [28].

Os fluorocromos que avaliam a integridade da membrana celular marcam os ácidos nucleicos de células individualizadas. Desta forma, as células com a integridade da membrana prejudicada permitem a entrada do marcador, que irá emitir fluorescência aquando da ligação, seja DNA ou RNA, como o caso do iodeto de propídeo (IP). Os fluorocromos, como os dihexilcarbocianina 2 e 6 (DiOC₂ e DiOC₆), determinam o potencial de membrana, uma vez que são lipofílicos e ligam-se de acordo com a sua carga. Tal acontece quando a membrana fica estruturalmente danificada e, conseqüentemente, há diminuição da atividade celular. [28].

Para obter dados estatísticos sobre as células em estudo, habitualmente localizadas numa zona de análise, deve definir-se um intervalo (*gate*) que permitirá saber a média, a mediana de fluorescência, o desvio do valor padrão e o coeficiente de variação [29].

A qualidade de cada ensaio varia de acordo com a otimização do melhor fluorocromo para o estudo adequado dos parâmetros a avaliar. Para tal, usa-se o controlo de autofluorescência para detetar se os componentes da amostra possuem fluorescência – falsos positivos [27]. A autofluorescência é a fluorescência inerente de uma partícula sem utilização de coloração/fluorocromo [30]. A sua interferência depende da concentração do marcador fluorescente, da concentração da amostra e da intensidade relativa de fluorescência, nas condições da experiência [27]. O ruído (ou *background*) corresponde ao sinal detetado quando não há partículas no detetor. Este parâmetro limita a sensibilidade do aparelho na detecção da fluorescência [30].

A FCM tem várias aplicações: determinação da eficácia da terapia anti-inflamatória e os efeitos secundários (em ensaios clínicos), isolamento de culturas puras, classificação celular (*in vitro* e *in vivo*) e fenótipo de células imunes (definido pelos padrões e níveis de expressão das moléculas à superfície). Em complementaridade com a imagiologia de ressonância magnética, a FCM permite a quantificação do número de células tumorais em circulação, que atuam como biomarcador de metástases [25].

Esta técnica é muito utilizada nos laboratórios clínicos e foi revolucionária em áreas como hematologia e imunologia, relativamente ao estudo de células humanas, e tem sido demonstrado o seu enorme potencial em áreas como a microbiologia [28].

2.4. Doseamento de antimicrobianos

O doseamento de antimicrobianos corresponde ao estudo das concentrações de fármaco existentes no organismo; no entanto só é realizado em questões de toxicidade, por exemplo, para a vancomicina. A terapêutica empírica, a longo prazo, acarreta custos hospitalares elevados, por isso torna-se essencial a otimização das dosagens atualmente utilizadas para os antibióticos, uma vez que, progressivamente, se verificam escolhas terapêuticas inadequadas, no que diz respeito ao antimicrobiano e à dosagem aplicada [31]. A par de TSA eficazes, este estudo é particularmente importante para doentes hospitalizados em unidades de cuidados intensivos (UCI), com insuficiência hepática e renal, e presença de edemas [32,33].

A eficácia da terapêutica antimicrobiana é essencial, em especial, nos casos de sepsia, choque séptico e infeções associadas aos cuidados de saúde (usualmente, microrganismos resistentes). Algumas das razões para que a eficácia seja inferior são: terapêutica empírica e/ou dosagem inadequada. Quando a dosagem é sub-ótima pode ocorrer o desenvolvimento de infeções secundárias e mecanismos de resistência [33]. Além disso, ocorre uma maior manifestação de efeitos adversos, o que leva a uma interrupção do tratamento - o que proporciona condições propícias ao desenvolvimento de resistência [31].

Desta forma, para a otimização da dosagem é essencial o estudo da farmacodinâmica (em inglês, *pharmacodynamic* – PD) e farmacocinética (em inglês, *pharmacokinetic* – PK). A relação PK/PD permitirá o estudo da dosagem ótima para a terapêutica adequada às necessidades do doente. A PK avalia os efeitos provocados pelo organismo no fármaco, como descrito pelo processo de absorção, distribuição, metabolização e excreção. Já a PD corresponde aos resultados obtidos pela atividade farmacológica. No caso dos antimicrobianos, o resultado deverá ser um efeito bactericida ou bacteriostático no local de infeção [31,34].

O valor laboratorial da MIC é o método atual utilizado para prever o efeito clínico; no entanto, devido às interações entre a tríade hospedeiro – fármaco – microorganismo (Figura 2), o valor efetivo da MIC será alterado devido ao

metabolismo do doente. Desta forma, uma avaliação da relação PK/PD permite obter resultados fidedignos para a adequação da terapêutica [31].

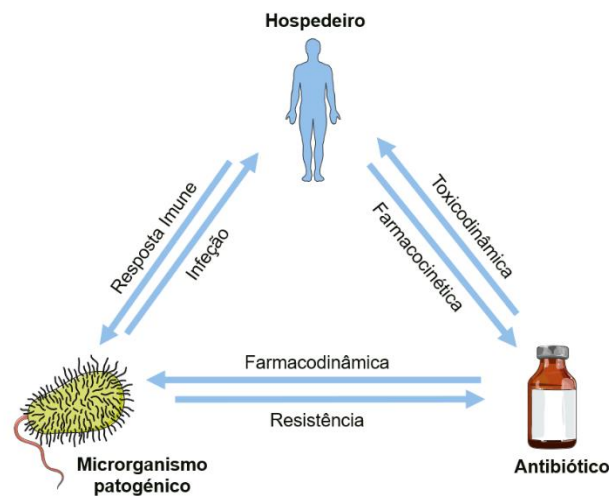


Figura 2 - Tríade de interação hospedeiro - microrganismo - antibiótico em caso de infeção.

Adaptado de: Asín-Prieto et al., 2015.

A metodologia de dosagem varia consoante as classes de antimicrobianos. Por um lado, os beta-lactâmicos (como penicilina e cefalosporinas) atuam de forma dependente do tempo e por isso são eficazes preferencialmente em concentrações superiores à MIC durante o intervalo de dosagem; ou seja, para estes antibióticos é interessante uma frequência elevada de administração. Por outro lado, os aminoglicosídeos (como gentamicina) e as fluoroquinolonas (como levofloxacina) são dependentes da concentração e neste caso é importante a concentração no plasma e não a frequência de administração [35].

De acordo com estudos prévios, acredita-se que o efeito terapêutico é conseguido pela fração de fármaco disponível nos tecidos envolventes do local de infeção e não pela fração plasmática (menos concentrada). Para avaliar os tecidos envolventes é utilizada a microdiálise. Esta técnica permite a recolha de pequenos volumes de soluto do fluído intersticial que são posteriormente analisados. Apesar de ser um método pouco invasivo e permitir análise de vários solutos, tem como desvantagens ser um processo desconfortável e longo, aliado ainda a elevados custos [31]. Além de que a análise por HPLC não permite a identificação de fármaco na forma ativa.

As dosagens aplicadas na terapêutica devem ser eficazes para toda a microbiota presente no local de infeção, o que inclui bactérias suscetíveis e resistentes

(independente da extensão dos seus mecanismos de resistência) [34]. Assim, tendo como base a relação PK/PD e a MIC será possível a dosagem personalizada de fármacos a cada doente. Esta estratégia permitirá uma terapêutica dirigida e assertiva, sendo possível obter resultados promissores no que diz respeito a melhorias clínicas, redução da toxicidade e mortalidade [32]. Para populações de doentes em UCI, deixamos de lado o *one size fits all* e preparamo-nos para a *personalized medicine*.

2.5. Colistina (Polimixina E)

Desde há muito que o problema da nefro e neurotoxicidade levou ao desuso das polimixinas, em favorecimento de outras classes de antibióticos. No entanto, nestas classes de antibióticos, como o caso dos aminoglicosídeos, começou a surgir evidência do desenvolvimento de multirresistências por parte de bactérias *Gram*-negativas, por isso, as polimixinas foram novamente adicionadas à terapêutica. [36]

Assim, atualmente, as polimixinas são usadas como último recurso na terapêutica associada a superbactérias *Gram*-negativas resistentes aos fármacos usados correntemente. Dois exemplos são as polimixinas B e E (colistina) [37].

A colistina é um antibiótico polipeptídico constituído por dois componentes: colistina A (polimixina E1) e colistina B (polimixina E2) [38] e atua contra bactérias *Gram*-negativas, segundo uma relação dose-dependente [39]. Devido à sua nefrotoxicidade, é administrada, principalmente, por via endovenosa pelo seu pró-fármaco metassulfonato de colistina (CMS), que não possui atividade antibacteriana. Quando ocorre a biotransformação, o CMS é hidrolisado em colistina, que é capaz de causar a rápida morte bacteriana [38,40,41].

De acordo com Plachouras et al. [42] e Garonzik et al. [43] verifica-se que a dosagem recomendada leva a concentrações plasmáticas sub-ótimas, que por si só também propiciam o desenvolvimento de resistências a este fármaco de última linha [31,33,37,40]. Para evitar este fenómeno, a estratégia passa por optar por altas doses de fármaco, de forma que as bactérias sofram morte celular imediata e não possuam a oportunidade de desenvolver mecanismos de resistência. Esta estratégia foi testada previamente por Rao et al. [40]. As polimixinas são apropriadas para este tipo de estratégia visto que o seu mecanismo de ação bactericida atua rapidamente quando a carga bacteriana é elevada [37].

Esta opção, também designada de *front loading*, permite minimizar a nefrotoxicidade do fármaco, pois há minimização da exposição ao fármaco. Esta estratégia já foi testada com outros fármacos [42,43], mas as polimixinas integram-se num grupo com futuro promissor possuírem atividade bactericida dose-dependente. [40].

De salientar que o interesse pela colistina ressurgiu devido à sua rapidez na atividade bactericida, espectro curto de atividade e estar associada a lentidão no desenvolvimento de resistência. Mas o conhecimento farmacológico é escasso e não está atualizado [41]. Assim sendo, há urgência na avaliação farmacológica, por otimização do seu regime de dosagem [36] para que possua diretrizes de dosagem bem definidas de forma que não se promova o desenvolvimento de resistências e também devido à sua toxicidade [41].

3. Objetivos

O objetivo primordial deste projeto foi o desenvolvimento e otimização do doseamento microbiológico da colistina por citometria de fluxo. Para tal estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a problemática da resistência aos antimicrobianos e as complicações em doentes críticos;
- Familiarizar-se com a técnica da metodologia clássica microdiluição em caldo;
- Entender o potencial e aplicar a técnica de citometria de fluxo no âmbito da microbiologia clínica;
- Compreender a importância da medicina personalizada pelo doseamento microbiológico de antibióticos;
- Preparar um protocolo de otimização de parâmetros citométricos para o doseamento;
- Interpretar os resultados obtidos.

4. Metodologia

Todos os procedimentos descritos foram realizados na câmara de fluxo laminar, de nível de biossegurança 2.

4.1. Estirpe utilizada

A estirpe em estudo foi a *Escherichia coli* ATCC® 25922™. Bactérias desta estirpe estavam conservadas a – 80 °C, numa solução de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (Liochem, Itália) suplementado com 20% de glicerol (Biochemopharma, França). A estirpe foi sub-cultivada em meio de cultura sólido *Mueller-Hinton* (BioMérieux, Portugal), antes da sua utilização de forma a garantir a sua viabilidade. A incubação realizou-se em estufa estática a 35 ± 2 °C, durante a noite.

4.2. Preparação da solução stock de antimicrobiano

A colistina (Sigma Aldrich, Alemanha) foi preparada de acordo com as normas do fornecedor. As concentrações preparadas foram selecionadas de acordo com os *breakpoints* referidos no protocolo M07-A11 de acordo com o CLSI [44] (Tabela 1).

Tabela 1 - *Breakpoints* de *Enterobacterales* para a colistina, de acordo com o CLSI.

Fenótipo de suscetibilidade para a colistina, por µg/mL		
S	I	R
Não definido	≤ 2	≥ 4

4.3. Protocolo de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana pelo método clássico – microdiluição

Inicialmente o valor da MIC das estirpes foi determinado pelo método de referência microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo para a realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos em bactérias disponibilizado pelo CLSI [45].

Para preparar as diferentes concentrações foram realizadas diluições seriadas do fármaco em meio de cultura líquido *Mueller-Hinton cation adjusted* Ca²⁺ (BioMérieux, Portugal) e distribuídos 100 µL em cada poço de placas de 96 poços (Thermo Scientific, Dinamarca), de acordo com as respetivas diluições.

De seguida, preparou-se o inóculo bacteriano ajustado a 0,5 *McFarland*, correspondente a 1×10^8 CFU/mL, em soro fisiológico, preparado internamente a partir do produto comercial cloreto de sódio (Scharlau, Espanha). Foram ainda preparados os controlos de validação do ensaio. O controlo positivo com apenas meio de cultura e inóculo bacteriano. O controlo negativo é composto pela concentração mais baixa de colistina e meio de cultura.

Após a inoculação das placas, decorre a incubação a 35 ± 2 °C durante 16 a 24 horas. Por fim, realiza-se a leitura visual dos resultados. A MIC é considerada como a menor concentração de fármaco que inibe o crescimento bacteriano.

4.4. Protocolo citométrico

4.4.1. Preparação de antimicrobianos, reagentes e placas

As placas de 96 poços a utilizar para a avaliação citométrica são compostas por diluições seriadas, em meio de cultura líquido Mueller Hinton (MHL; BioMérieux, Portugal), de colistina, com concentrações entre 64 e 0,125 µg/mL, soro humano e o marcador fluorescente (Figura 3). Sendo que esta solução compõe 100 µL de cada poço.

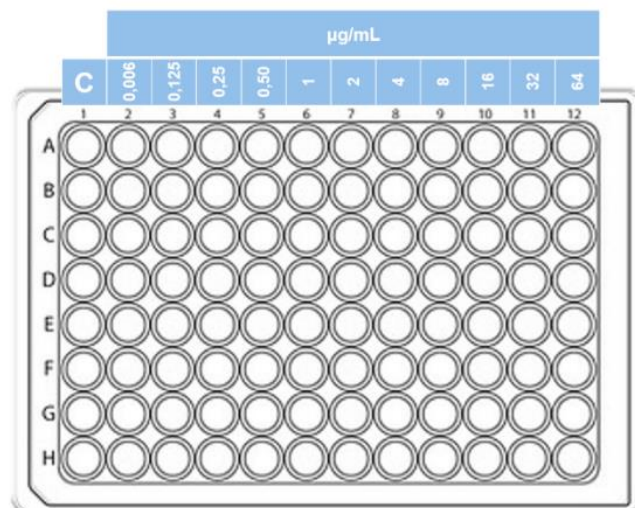


Figura 3 - Painel de disposição das placas para o doseamento microbiológico.

Foi incluído um controlo composto pela suspensão bacteriana e o fluorocromo. O fluorocromo usado foi o iodeto de propídeo (IP). Foi preparado de acordo com as indicações do fabricante e nas concentrações previamente otimizadas [46,47]. De

notar que durante e após a aplicação dos fluorocromos, as placas foram mantidas resguardadas da luz até ao momento de análise.

4.4.2. Obtenção da suspensão bacteriana

A estirpe *E. coli* ATCC® 25922™ foi sub-cultivada em meio de cultura MHA e deixada a incubar a $37^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante a noite. Seguiu-se preparação da suspensão das células bacterianas por ajuste do inóculo a 0,5 *McFarland*, em soro fisiológico, e preparou-se uma diluição 1:50 (de acordo com as otimizações previamente realizadas pela equipa [46]), em meio de cultura líquido Mueller-Hinton, previamente filtrado no sistema Millipore (Merck Millipore, EUA).

4.4.3. Aplicação/Otimização do protocolo citométrico para o doseamento

Para se proceder ao protocolo citométrico de doseamento, realizou-se a inoculação dos poços com 100 μL de suspensão bacteriana. De seguida, decorreu 1 hora de incubação agitada a $35 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Por fim, realizou-se a leitura citométrica no citometro de fluxo *CytoFlex* (Beckman Coulter, EUA), com análise dos histogramas de fluorescência.

5. Resultados

5.1. Protocolo de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana pelo método clássico – microdiluição

Os resultados da microdiluição para a estirpe em estudo estão descritos na tabela 2. A estirpe em estudo é considerada suscetível à colistina.

Tabela 2 - Avaliação da suscetibilidade da estirpe à colistina, por microdiluição.

Estirpe	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Fenótipo
<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	0,5 $\pm$ 1 diluição	S

5.2. Protocolo de doseamento microbiológico

Nas figuras 4 e 5 encontra-se a distribuição de fluorescência apresentada pela amostra controlo e a amostra correspondente ao MIC da colistina pelo doseamento, respetivamente. Na figura 5 verifica-se um aumento significativo da fluorescência

correspondente à marcação dos ácidos nucleicos, devido à rutura da membrana da célula.

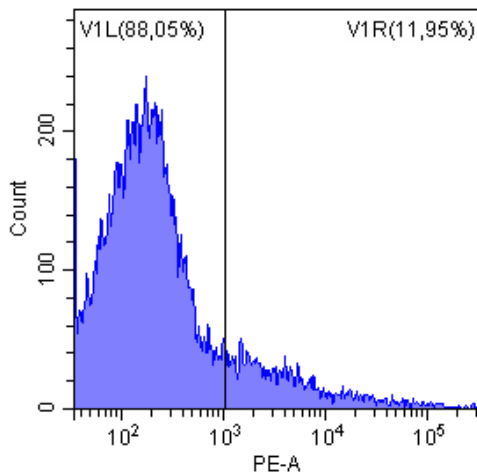


Figura 4 - Distribuição de fluorescência apresentada pela amostra controlo.

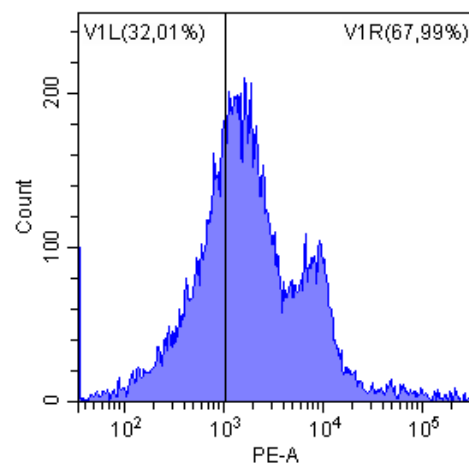


Figura 5 - Distribuição de fluorescência da amostra com marcação pelo IP.

6. Discussão

O presente capítulo “Doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo” tem como objetivo o desenvolvimento da prova de conceito do doseamento microbiológico da colistina por citometria de fluxo.

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça em ascensão e pode até ser denominada de “pandemia invisível ou silenciosa”. A eficácia da terapêutica antimicrobiana é essencial para a dinâmica hospitalar, evitando estadias longas e o recurso antibióticos de última linha, que usualmente são mais tóxicos e mais caros [7][8]. Esta problemática é mais complexa em casos de doentes imunossuprimidos, normalmente hospitalizados, sobretudo devido à crescente utilização de métodos mais interventivos e a emergência das resistências. Por exemplo, uma simples cirurgia pode acarretar sérios problemas, uma vez que pode ocorrer infeção por uma bactéria multirresistente para a qual não estará disponível a terapêutica eficaz [11].

Os TSA clássicos, essencialmente microdiluição em caldo e teste de difusão em disco, não permitem obter resultados rápidos [31] e, por essa razão, a terapêutica empírica torna-se comum. De forma a colmatar esta falha, a FASTinov® possui em desenvolvimento kits para rápida avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, por citometria de fluxo, para bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas, e até para

identificação de mecanismos de resistência, estando já em validação externa. Tal como também estudei no meu estágio curricular da licenciatura em Biotecnologia Medicinal, com o tema “Avaliação da suscetibilidade da bactéria *Streptococcus pneumoniae* diretamente a partir de hemoculturas por citometria de fluxo” [48], no qual tive a oportunidade de conhecer o protocolo citométrico em desenvolvimento na empresa.

No seguimento do desenvolvimento deste TSA rápido e emergente, surge a possibilidade de aplicação desta metodologia de citometria de fluxo inovadora noutros testes da microbiologia clínica, como o doseamento microbiológico de antibióticos.

Em doentes críticos com insuficiência renal e hepática, o doseamento de antibióticos é essencial para a melhoria do seu estado clínico. Nestes casos, há alteração da relação PK/PD e facilmente são administradas doses sub-ótimas, responsáveis por efeitos adversos ou ineficácia da terapêutica [33,49]. Portanto, são necessárias metodologias que permitam determinar as concentrações séricas de antibiótico que efetivamente chegam ao local de infeção e são capazes de provocar a decomposição da infeção. Uma das metodologias aplicadas atualmente é a microdiálise, que no entanto decorre num processo desconfortável e longo, e acarreta elevados custos [31]. Além de que os métodos químicos existentes, apesar da sua rapidez, não inferem relativamente à fração ativa do fármaco.

Surge assim a necessidade do desenvolvimento de estratégias de doseamento que permitam quantificar o fármaco na sua forma ativa, para ser possível a monitorização mais adequada da dosagem do antibiótico, de acordo com o historial clínico do doente.

O doseamento microbiológico aqui apresentado tem como base determinar as concentrações séricas de colistina em doentes críticos num intervalo de tempo útil, diretamente do soro do doente, para que a dosagem terapêutica aplicada seja eficaz (Figura 6).

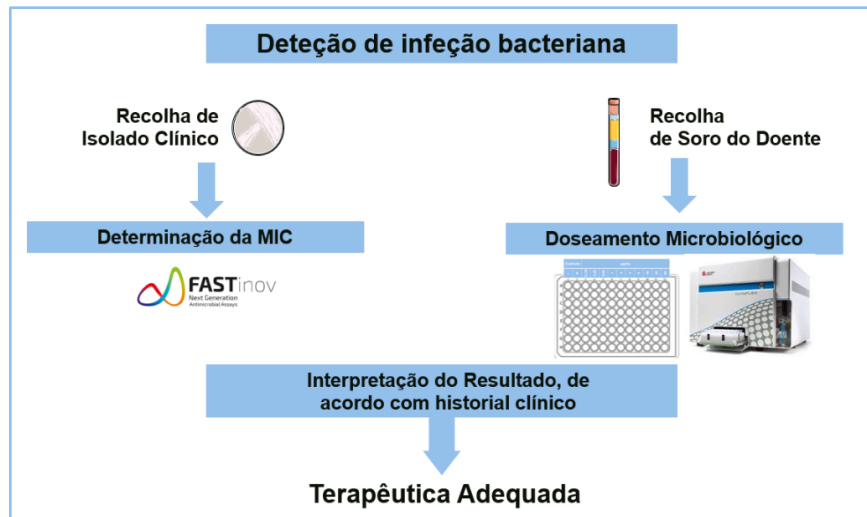


Figura 6 - Representação esquemática do protocolo a aplicar.

De forma a determinar a dose a administrar ao doente pelo doseamento microbiológico deve realizar-se a microdiluição em caldo para que seja determinada a MIC da bactéria para o antibiótico. De realçar, a importância da utilização de um TSA rápido e preciso, como está a ser desenvolvido pela FASTinov ®. Ainda assim, neste trabalho experimental foi usado o método clássico de microdiluição, pois é o método atual validado. De salientar que neste tipo de situações se verifica variações entre a MIC obtida laboratorial e a MIC clínica, devido aos efeitos metabólicos do organismo.

De seguida, realiza-se o doseamento por FCM. A FCM encontra-se em expansão na área da microbiologia, visto que é possível realizar a análise de parâmetros físicos e químicos de células, determinando, por exemplo, possíveis danos celulares provocados pelos antimicrobianos, de acordo com fluorocromo utilizado [25]. Assim será possível a determinação da concentração de antibiótico presente na amostra de soro do doente, num curto intervalo de tempo, de acordo com efeito produzido. Desta forma, a dosagem aplicada é otimizada de acordo com as necessidades do doente, evitando efeitos adversos de toxicidade ou desenvolvimento de resistência ao antibiótico.

Em primeiro lugar, e descrito neste relatório, foi avaliado o doseamento da colistina, visto ser um antibiótico de última linha com atividade bactericida contra bactérias *Gram*-negativas multirresistentes, atuando por grave lesão na membrana [38,40,41].

De salientar algumas desvantagens da colistina, sendo uma delas a sua capacidade de degradação de plásticos, sendo esse um fator a ter em conta em trabalhos laboratoriais, de forma a não enviesar os resultados obtidos. Além disso,

para a colistina, contrariamente aos beta-lactâmicos, não há necessidade do estado exponencial das células bacterianas para se testar a atividade farmacológica [46].

O soro humano é utilizado frequentemente como amostra biológica para o doseamento farmacológico. Aliás, devido a questões de nefrotoxicidade da vancomicina, é aconselhável a utilização do soro [50]. Da mesma forma, devido à nefrotoxicidade da colistina, utiliza-se a mesma amostra biológica.

A aplicação da citometria de fluxo implica ter alguns cuidados como a seleção adequada do marcador de fluorescência para o objetivo do estudo. Neste caso, previamente foram avaliados uma vasta gama de marcadores fluorescentes, na fase de otimização do FASTcolistin MIC kit da FASTinov® e publicado no artigo intitulado “Ultra-rapid flow cytometry assay for colistin MIC determination on *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*” [46]. O fluorocromo IP foi utilizado devido sua facilidade em discriminar células viáveis de células mortas, como confirmação da atuação do antimicrobiano. As células marcadas pelo IP têm os seus ácidos nucleicos expostos, por consequência da grave rutura da membrana celular causada por fármaco. Este fluorocromo é excitado pelo laser azul a 488 nm, podendo ser detetado por dois detetores: PE-A (utilizado neste ensaio experimental) e PC5.5-A. Sendo assim, quanto mais fluorescência se verificar, maior a quantidade de DNA que foi intercalado, o que indiretamente pode significar que maior foi a sua entrada, o que só acontece quanto maior será o dano celular provocado na membrana.

De acordo a prova de conceito realizada, após a análise dos histogramas é possível determinar a concentração sérica de colistina presente no soro e com efeito na infeção, visto ser correspondente ao poço de concentração superior em que se verifica um aumento de fluorescência.

No trabalho apresentado foi apenas usada uma estirpe de controlo de qualidade (*E. coli* ATCC® 25922™), como prova de conceito, sendo esta estirpe recomendada para TSA no caso dos *Gram*-negativos. De salientar, a técnica assética foi um fator fulcral ao longo do desenvolvimento dos protocolos definidos como forma de garantir a fidedignidade dos resultados apresentados; assim como a biossegurança individual e coletiva de acordo com as boas práticas de laboratório. A existência de amostras de controlo e a padronização por 0,5 *McFarland*, correspondente a 1×10^8 CFU/mL, permitiram também comprovar a confiança nos resultados.

Concluindo, justifica-se assim a necessidade do desenvolvimento de estratégias capazes de determinar a PD e PK da colistina de forma a delimitar a dosagem terapêutica indicada para cada população de doentes ou então em cada doente individualmente.

Em termos de perspetivas futuras, podem levantar-se questões relativas ao estudo de outros fármacos, como a vancomicina, que atua contra bactérias *Gram*-positivas, que contrasta com a colistina, biocida de bactérias *Gram*-negativas. Desta forma, poderá obter-se uma visão mais alargada do potencial desta metodologia de doseamento microbiológico. Aliás, a aplicação desta metodologia em ambiente hospitalar implica a validação da mesma por comparação com outro método já implementado e comum na prática clínica; sendo este também um trabalho futuro.

Impacto da nebulização seca de H_2O_2/Ag^+ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados

1. Enquadramento: Serviço e laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto

A Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) possui uma vasta investigação científica. Em especial, no departamento de patologia, o serviço e laboratório de microbiologia da FMUP, dirigido pelo Professor Doutor Acácio Rodrigues, é responsável pelo desenvolvimento de investigação na área da microbiologia.

Um dos projetos em execução é “Impacto da nebulização seca de H_2O_2/Ag^+ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados” (POCI-01-0145-FEDER-031755), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia. Este projeto tem como objetivo restringir a emergência de resistências aos antimicrobianos e diminuir as infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS), principalmente em doentes críticos; neste caso, associado à unidade de Queimados (UQ) do Centro Hospitalar Universitário S. João (CHUSJ). Tendo como desinfetante o H_2O_2 , pretende-se estudar a utilização do mesmo, numa formulação vaporizada, para efetuar a ação biocida em superfícies, num período pré-determinado.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Transmissão microbiológica em unidades de cuidados intensivos

Alta mortalidade, custos elevados e estadia hospitalar longa são efeitos resultantes de IACS. Muitas destas infeções devem-se a transmissão por contacto entre doentes e as mãos dos profissionais de saúde; seja por contacto direto com a pele do doente ou por transmissão através de superfícies contaminadas. A desinfecção manual - a mais comum - não é capaz de remover todos os microrganismos e, por essa razão, as superfícies ainda contaminadas permitem manter um fluxo contínuo de transmissão e infeção [51].

Atualmente, os indivíduos possuem esperança de vida mais longa e com isso surgem condições de doenças cada vez mais graves; no entanto, os avanços médicos permitem que os doentes sobrevivam durante mais tempo. Consequentemente, devido às alterações imunitárias e às suas comorbidades, tornam-nos suscetíveis à infecção. De notar que estes doentes são sujeitos a terapêuticas progressivamente mais invasivas que rompem as suas barreiras naturais, o que aumenta a sua suscetibilidade [52].

Além disso, é nas UCIs que perduram as resistências aos antibióticos e, por consequência, é nestes locais que surgem as bactérias multirresistentes. Tal deve-se a vários fatores inerentes a estas unidades de saúde como: (1) terapêutica empírica em excesso, causando uma pressão seletiva nas bactérias resistentes, (2) uso de equipamentos invasivos e (3) doentes mais suscetíveis e com comorbidades [52]. Assim, devido ao aumento da suscetibilidade dos doentes em UCIs, as infecções que contraem advêm de microrganismos resistentes e, por essa razão, a terapia é realizada progressivamente com antimicrobianos mais potentes, forçando-os a adaptarem-se ao ambiente [52].

Um exemplo de depósito bacteriano no organismo humano são os abscessos, que reservam bactérias aptas ao desenvolvimento de resistências por mutações ou transferência génica. Estas bactérias resistentes são, então, responsáveis por infecções graves que prolongam a estadia hospitalar, aumentam a morbilidade e acarretam custos hospitalares [52].

Um outro exemplo são as feridas. As feridas são um combinado de tecido morto, exsudado e carga bacteriana. No caso específico das feridas difíceis de tratar, estas são responsáveis por perda de qualidade de vida, como falta de mobilidade e alterações fisiológicas. Nestas feridas, o tratamento é prolongado devido ao excesso de carga bacteriana presente, em conjunto com o exsudado em quantidades excessivas e, em alguns casos, a exposição de elementos anatómicos [53].

Um fator de virulência comum que permite a manutenção e até o aumento da carga bacteriana nos doentes é a formação de biofilmes. As células em proliferação organizam-se em biofilmes composto pelas células bacterianas e uma matriz polimérica, responsável pela adesão ao local de infecção. A organização em biofilme permite às bactérias perseverar em ambientes adversos através de relações simbióticas entre elas, seja em feridas ou em superfícies [53].

A associação microbiana em biofilmes confere vantagens competitivas aos microrganismos envolvidos como: redução do acesso e da interação com biocidas, modelação do seu microambiente, produção de enzimas degradativas e transferência de genes entre variadas células. Por outro lado, este tipo de interação reduz o acesso a nutrientes, resultando na diminuição da taxa de crescimento que, por sua vez, aumenta a suscetibilidade a biocidas [54].

Relativamente a resistências aos antimicrobianos, neste tipo de estrutura verifica-se a expulsão do antimicrobiano devido à alta densidade celular. Ainda assim, a propensão para desenvolvimento de mecanismos de resistência é elevada, como, por exemplo, em resposta ao stress nutricional. De salientar que as células organizadas em biofilme têm ainda propensão para o desenvolvimento de mecanismos de resistências para com o sistema imune do hospedeiro [53].

Este tipo de organização celular é comum em feridas difíceis de tratar, por ser um ambiente propício ao crescimento bacteriano, e são responsáveis pela morbidade, visto que são difíceis de remover, persistindo mesmo depois do desbridamento [53]. Além disso, são comuns em equipamentos médicos e implantes. Nestes objetos são capazes de aumentar a taxa de infeção e aumenta a probabilidade de reinfeção [54].

Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de estratégias capazes de efetuar uma desinfeção completa, como a utilização do peróxido de hidrogénio [51].

2.2. Peróxido de hidrogénio

Os antisépticos e os desinfetantes são produtos encontrados em unidades de saúde para utilização na limpeza do espaço. Por essa razão, são cruciais para controlo e prevenção de infeções [54].

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é um biocida usado em desinfeção e esterilização. É um produto disponível comercialmente em variadas concentrações (3 a 90%) de acordo com a finalidade. O H_2O_2 age como oxidante, produzindo radicais livres hidroxilo que, por sua vez, reagem com componentes celulares. Devido à sua interação química, é considerado amigo-do-ambiente, pois rapidamente se degrada em água e oxigénio. Pela mesma razão, muitas das vezes possui na sua constituição estabilizadores da formulação química para evitar a decomposição [54].

Como biocida, o H_2O_2 atua em vírus, bactérias e leveduras. É mais eficaz contra bactérias *Gram*-positivas do que negativas. A presença de catalase e

peroxidase permite o aumento da tolerância dos microrganismos ao H_2O_2 , uma vez que o mesmo é degradado pelas enzimas. De notar que para atuar em esporos, o tratamento requer altas concentrações e mais tempo de exposição [54].

Os biocidas comuns a altas concentrações são responsáveis por grandes danos celulares. Os biocidas oxidantes, como o H_2O_2 , o dióxido de cloro e o ácido peracético, atuam por remoção de eletrões de grupos suscetíveis (como os grupos tiol das enzimas e proteínas, DNA e membrana celular das bactérias), resultando na sua oxidação. Já a baixas concentrações, o fenómeno de oxidação-redução é facilmente reversível e desta forma os microrganismos são capazes de criar mecanismos de defesa como a aquisição de resistência [55].

Relativamente à formulação usada com H_2O_2 , estas podem sofrer alterações de forma a intensificar a sua atividade. No caso, as formulações líquidas não possuem a mesma capacidade de penetração em estruturas tridimensionais do que as formulações vaporizadas [55]. A atividade antimicrobiana pode ser influenciada por: formulações, presença de carga orgânica, sinergia, temperatura, diluições e método de teste [54]. Atualmente, os ciclos de desinfecção em que se usa este biocida numa formulação vaporizada são longos, tornando inviável a sua implementação em ambiente hospitalar, por exemplo, nos quartos dos doentes [56].

De salientar ainda que devido ao risco de infeção ser transversal à comunidade, cada vez mais os desinfetantes e os antisépticos são mais usados na sua generalidade pelas pessoas, com variadas finalidades (também devido à pandemia de COVID-19). Os produtos comerciais possuem vários produtos químicos, como os biocidas. Estes são capazes de atuar mais amplamente do que os antibióticos, pois possuem vários alvos intracelulares. Desta forma, surge a questão relativa ao desenvolvimento de resistências aos desinfetantes usadas comumente, tanto pela comunidade como pelos profissionais de saúde [54].

3. Objetivos

Tendo como objetivo global a utilização de um biocida em vapor seco para desinfecção de superfícies num período reduzido, foi necessário estabelecer os seguintes objetivos específicos de:

- Estudar questões relativas à desinfecção hospitalar, manual e automática;
- Avaliar o efeito antimicrobiano do biocida na microbiota presente na UQ:

- Conhecer e aplicar uma técnica de crescimento celular em biofilme;
- Efetuar desinfecção *in vitro* com método automático;
- Analisar a viabilidade e quantidade celular, por espectrofotometria;
- Determinar o possível efeito indutor de resistência pelo H₂O₂:
 - Efetuar a indução de resistência de acordo com a metodologia pré-definida;
 - Identificar e distinguir fenotipicamente bactérias e leveduras;
 - Determinação da suscetibilidade ao H₂O₂ por microdiluição;
- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa de isolados ambientais:
 - Distinguir colónias bacterianas;
 - Conhecer e aplicar a técnica de MALDI-TOF;
- Interpretar os resultados obtidos à luz da sua importância clínica.

4. Metodologia

4.1. Efeito antimicrobiano do H₂O₂ na desinfecção de superfícies colonizadas com biofilmes

Para o desenvolvimento desta atividade foram utilizadas algumas estirpes de controlo mais comuns nas UCI, descritos na tabela 3. As estirpes são conservadas a – 80 °C, em meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (Biolab, Hungria) suplementado com 20% de glicerol.

Tabela 3 - Descrição das estirpes utilizadas.

Estirpe	Código ATCC ®
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213 TM
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35984 TM
<i>Candida albicans</i>	10231 TM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603 TM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606 TM

De forma a mimetizar as superfícies hospitalares presentes na UQ foram preparados pequenos quadrados/peças (2cm x 2cm), de acordo com os materiais em estudo: fórmica, inox, linóleo, napa e PVC.

A estirpes selecionadas crescem a 35 ± 2 °C durante 72 horas em meio de cultura sólido Brain Heart Infusion (BH) para bactérias ou Sabourad Dextrose Agar (SAB; Liofilchem, Itália) para leveduras. De seguida, as bactérias são novamente

incubadas em meio líquido: Luria-Bertani (LB; Formedium, Inglaterra) para bactérias e Sabourad Dextrose Broth (Liofilchem, Itália) para leveduras e incubadas a 35 ± 2 °C com agitação (150 rpm), durante 2 horas, de forma a atingirem a fase exponencial de crescimento.

O inóculo é transferido para um tubo *Falcon* 50 mL, o qual é centrifugado durante 5 minutos a 9000 rpm. Rejeita-se o sobrenadante no Erlenmeyer e o *pellet* é ressuspenso em 30 mL de soro fisiológico. De seguida realiza-se a padronização da amostra por 0,5 *McFarland* (corresponde a 1×10^6 CFU/mL para leveduras e 1×10^8 CFU/mL para bactérias). Por fim, dilui-se a amostra em 1:10, em meio de cultura respetivo, e distribui-se nas placas de 6 poços, nas quais previamente se dispuseram os materiais. As placas são deixadas a incubar durante 48 horas, a 35 ± 2 °C. Passadas 24 horas, verificam-se possíveis contaminações por crescimento em meio de cultura sólido das amostras.

Após as 48 horas e a confirmação de possíveis contaminações, preparam-se as placas para exposição aos ciclos de H₂O₂ vaporizado. Em novas placas de 6 poços dispõem-se, em cada poço, as peças de material com possível biofilme, na vertical. Antes de adicionar as peças de material, estas são mergulhadas brevemente em PBS, como processo de lavagem. Os ciclos de exposição ao H₂O₂ (7%) vaporizado testados foram o ciclo mini (CM; correspondente a 15 min, correspondente a 5 m³) e ciclo normal (CN; 30 min, correspondente a 15 m³).

Após a exposição ao desinfetante foram realizados dois testes: Cristal Violeta (CV) e ensaio do 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). Foram utilizados os controlos descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Condições controlo do ensaio.

Controlo	Condições
Negativo	Peças de material sem inóculo nem exposição ao H ₂ O ₂
Positivo	Peças de material com inóculo e sem exposição ao H ₂ O ₂

No teste do CV, o composto liga-se a células presentes na matriz extracelular e permite inferir relativamente à capacidade de crescimento em biofilme. [57] Neste caso, as peças são realocadas em tubos *Falcon*, aos quais previamente se adicionou 10 mL PBS. Cada amostra é vortexada e sonicada por 2,5 minutos. A peça de material é removida e o conteúdo do tubo *Falcon* é centrifugado durante 5 min a 9000 rpm. De seguida, é descartado o sobrenadante e o *pellet* é ressuspenso em 1 mL de PBS e transferido para um tubo *ependorf*. A amostra é novamente centrifugada e o

sobrenadante é descartado. Adiciona-se 1 mL de CV 0,5%, vortexa-se as amostras e deixa-se em repouso durante 20 minutos, para que se dê a reação. As amostras são centrifugadas durante 5 minutos a 14000 rpm e rejeita-se o sobrenadante. A seguir, decorrem 3 lavagens sucessivas com água estéril e remoção do sobrenadante. Por fim, adiciona-se 1 mL de Ácido Acético (33%) e a amostra é vortexada e centrifugada. Transfere-se 200 µL de cada amostra para um poço respetivo numa placa de 96 poços, a qual será analisada no espectrofotómetro com leitor de microplacas – PowerWave XS (BioTek, EUA), no comprimento de onda de 590 nm. De notar que as amostras do teste do CV podem ter a necessidade de diluição, em ácido acético (33%).

No caso do XTT, o método baseia-se na redução do XTT a um produto solúvel em água de cor laranja, por células viáveis. Através da leitura da absorvância deste composto será possível determinar a viabilidade celular das amostras. [58] Assim, prepara-se a solução composta por 4 mL PBS, 50 µL XTT e 4 µL de Menadiona (por amostra). Realocam-se as peças de material em placas de 6 poços limpas e adiciona-se 4 mL de solução de XTT a cada poço. De seguida, incuba-se durante 24 horas, a 35 ± 2 °C. Após a incubação recolhe-se 1 mL de sobrenadante de cada poço para um tubo *ependorf*, que é centrifugado a 14000 rpm, durante 5 minutos. Por fim, transfere-se 200 µL de sobrenadante de cada amostra para um poço respetivo numa placa de 96 poços, a qual será analisada no espectrofotómetro com leitor de microplacas – PowerWave XS, no comprimento de onda de 490 nm.

4.2. Indução de resistência do H₂O₂

No âmbito do projeto surge também o estudo da possível indução de resistência provocada pelo H₂O₂. Para tal foram estudadas leveduras (*C. albicans* e *Candida auris*) e bactérias (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecium*) comuns nas UCI.

A atividade iniciou-se por determinação da MIC de cada estirpe, pela técnica de microdiluição (previamente descrita e adaptada às concentrações de H₂O₂ a avaliar), de acordo com o protocolos do CLSI, para bactérias M07-A11 e leveduras M27-A3S4 [45][59].

Sabendo a MIC de cada estirpe ao H₂O₂, a indução realizou-se por incubação das estirpes com 3 concentrações de H₂O₂ correspondentes ao $\frac{1}{2}$ MIC, 1 MIC e 2

MIC. Exceto o *E. faecium* em que se utilizaram as seguintes concentrações: $\frac{1}{16}$ MIC, $\frac{1}{32}$ MIC e $\frac{1}{64}$ MIC.

A solução na qual as estirpes eram incubadas era repostada diariamente e composta por 8,9 mL de meio de cultura líquido constituído por extrato de levedura, peptona e dextrose (em inglês, *yeast extract-peptone-dextrose* – YPD) para leveduras ou LB para bactérias, 100 µL solução de H₂O₂ respetiva e 1 mL inóculo. O controlo positivo era composto por 9 mL de meio de cultura e 1 mL de inóculo. O controlo negativo era composto apenas por meio de cultura. A incubação decorre durante 24 horas com agitação a 35 ± 2 °C, até que se renovam as condições do meio. A cada dia é recolhida 1 amostra para congelação (500 µL de inóculo) em YPD ou LB suplementado com 20% de glicerol. Regularmente, as amostras são também repicadas de meio de cultura sólido para controlo de possíveis contaminações cruzadas.

A cada 20 dias é verificado a MIC, por microdiluição, de cada amostra para confirmar a existência ou ausência de indução de resistência. A indução é realizada até ao máximo de 60 dias de incubação na presença de H₂O₂.

4.3. Análise quantitativa e qualitativa de isolados ambientais durante o ciclo de limpeza e desinfeção

A par da avaliação da desinfeção por ciclos mais rápidos por H₂O₂ vaporizado e do estudo da indução de resistência, realizou-se o estudo da microbiota ambiental da UQ. Para tal, foram recolhidas, em placas de contacto de BH, e de diclorano de glicerol (DG18; Liofilchem, Itália) para o isolamento específico de fungos, amostras do quarto de cada doente, respetiva visita à sala da balneoterapia e bloco operatório. Foram recolhidas antes (sujo) e depois da limpeza manual (limpo) realizada pela equipa de limpeza hospitalar, e após a desinfeção (desinfetado) por vaporização de H₂O₂ 7% (apenas realizado no bloco operatório). São ainda recolhidas amostras do ar, com recurso a um equipamento próprio de recolha de ar, MAS-100 Eco (Merck, Alemanha) em ambos os meios de cultura.

Após a recolha nos pontos designados (Tabela 5), as placas de contacto são incubadas durante 24 horas e as placas de DG18 durante 48 horas. Após a incubação, as placas são analisadas macroscopicamente para distinção de colónias e contagem de unidades formadoras de colónias (CFUs). Cada amostra é armazenada a – 80 °C, em LB suplementado com 20% de glicerol, e identificada por MALDI-TOF.

Tabela 5 - Pontos de recolha de isolados ambientais na UQ.

Espaço	Nº	Local	Nº	Local
Quarto do doente (Q)	1	<i>Bed-rails</i>	8	Interruptor da porta
	2	Colchão (cabeceira)	9	Interruptor da luz
	3	Colchão (meio)	10	Interruptor persianas da janela das visitas
	4	Colchão (meio por baixo)	11	Parede (cabeceira da cama)
	5	Painel de controlo da seringa perfusora	12	Parede (pés da cama)
	6	Ecrã de sinais vitais	13	Carrinho de apoio
	7	Monitor de ventilação	14	Chão
Balneoterapia (BA)	20	Marquesa (a meio)	26	Paredes – pés da marquesa
	21	Marquesa (a meio por baixo)	27	Parede sobre o lavatório
	22	Manípulo do chuveiro	28	Parede (à esquerda da porta de entrada)
	23	Monitor de sinais vitais	29	Parede (à direita da porta de entrada)
	24	Interruptor da porta	30	Chão
	25	Interruptor de luz		
Bloco Operatório (BO)	35	Marquesa (por baixo, ao fundo)	41	Parede 1 (pés da marquesa)
	36	Teclado do computador	42	Parede 2 (à direita da porta de entrada)
	37	Monitor de sinais vitais	43	Parede 3 (cabeceira da marquesa)
	38	Monitor do ventilador	44	Parede 4 (à esquerda da porta de entrada)
	39	Interruptor da porta	45	Chão
	40	Interruptor da luz		
Exemplo de código identificativo:				
"BA23II", réplica da amostra do monitor de sinais vitais da sala de balneoterapia.				

Para a análise por MALDI-TOF, cada amostra é repicada em BH. Para as amostras não identificáveis foi realizado um procedimento de extração de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. Os fungos filamentosos encontrados são identificados por análise microscópica direta, com recurso ao corante azul de algodão, por deteção do conidióforo e a sua organização.

Além do estudo da microbiota ambiental da UQ, foram disponibilizados ainda isolados clínicos valorizáveis provenientes de amostras biológicas dos doentes da UQ. As amostras eram previamente processadas e identificadas pelo departamento de microbiologia do CHUSJ.

5. Resultados

5.1. Efeito antimicrobiano do H₂O₂ na desinfecção de superfícies colonizadas com biofilmes

Os resultados descritos para o estudo do efeito antimicrobiano do H₂O₂ em biofilmes apresentados servem de exemplo aos vários ensaios realizados. Assim para a quantificação de biofilme, por CV, apresenta-se os resultados obtidos num ensaio de *A. baumannii* ATCC ® 19606™ e para o ensaio de viabilidade celular, por XTT, a estirpe para qual se apresentam o resultado de um ensaio é *K. pneumoniae* ATCC ® 70063™.

Para o teste do CV com a estirpe *A. baumannii* ATCC ® 19606™ (Tabela 6), para a fórmica, verifica-se uma diferença significativa de absorbância, em que no CN a quantidade de células é inferior às outras condições (mesmo até para o controlo negativo).

No controlo negativo seria de esperar absorbância baixa visto que não possuem inóculo. Para o inox, a variação de valores entre o CN e CM indica maior desinfecção no CM. Para o linóleo, da mesma forma, o CM apresenta menor absorbância que o CN, indicando menor carga bacteriana; sendo que ambos os ciclos apresentam valor de absorbância inferior ao controlo negativo. Para a Napa, contrariamente, o CM é que apresenta maior valor de absorbância. Além disso, o controlo negativo apresenta absorbância superior ao controlo positivo. Para o PVC, a variação de valores entre o CN e CM indica maior desinfecção no CM; sendo valores de absorbância superiores a ambos controlos.

Tabela 6 - Estudo de quantificação celular de *A. baumannii*, pelo teste de CV.

CV	Fórmica	Inox	Linóleo	Napa	PVC
C-	0,503	0,471	0,618	0,600	0,412
C+	0,643	0,601	0,420	0,568	0,497
CM	0,656	0,394	0,442	0,833	0,359
CN	0,382	0,401	0,786	0,707	0,374

No que se refere ao ensaio de viabilidade celular com XTT com a estirpe *K. pneumoniae* ATCC® 70063™ (Tabela 7), em que maior absorbância é indicativa de viabilidade celular; para a fórmica, nos ciclos de desinfecção, os valores de absorbância são semelhantes. Para o inox, a diferença entre ciclos não é significativa; no entanto, a absorbância obtida pelo controlo negativo é, comparativamente, mais elevada. Para o linóleo, os valores foram todos semelhantes. Para a Napa, o controlo negativo foi o que apresentou valor superior de absorbância, seguido dos dois ciclos de desinfecção. Por fim, no PVC, para os ciclos de desinfecção, verifica-se que o menor valor de absorbância corresponde ao CM.

Tabela 7 - Estudo de viabilidade celular da *K. pneumoniae*, pelo ensaio de XTT.

XTT	Fórmica	Inox	Linóleo	Napa	PVC
C-	0,097	0,111	0,090	0,158	0,059
C+	0,119	0,071	0,099	0,124	0,076
CM	0,124	0,036	0,109	0,135	0,065
CN	0,129	0,047	0,091	0,133	0,074

5.2. Indução de resistência do H₂O₂

Para o desenvolvimento do estudo do efeito indutor de resistência do H₂O₂ foram utilizadas várias estirpes de leveduras e bactérias. A escolha das leveduras baseou-se na sua suscetibilidade aos antifúngicos comuns, de forma a ser possível avaliar o efeito indutor do H₂O₂ em leveduras suscetíveis e resistentes (Tabela 8). Além disso, é interessante salientar o resultado do teste da catalase para cada estirpe. Do mesmo modo também as estirpes bacterianas escolhidas tiveram por base a sua suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 9).

Tabela 8 - Informação relativa às leveduras em estudo.

Estirpe	Informação	
	Catalase	Fenótipo de Suscetibilidade
<i>C. albicans</i> ATCC® 90028™	-	Suscetível aos antifúngicos mais comuns
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	-	
<i>C. auris</i> DSMZ 21092	+	
<i>C. auris</i> NCPF 8971	+	
<i>C. auris</i> NCPF 8977	+	

Tabela 9 - Informação relativa às bactérias em estudo.

Estirpe	Informação disponível	
	Catálase	Fenótipo de suscetibilidade
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213™ (S)	+	Sensível à Oxacilina
<i>S. aureus</i> ATCC® 43300™ (R)	+	Resistente à Meticilina e Oxacilina
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853™ (S)	+	
<i>P. aeruginosa</i> PS023 (R)	+	Resistente ao Azitreonam, Cefepime e Piperacilina/Tazobactam
<i>E. faecium</i> Isolado Clínico UQ (S)	-	
<i>E. faecium</i> ATCC® 700221™ (R)	-	Resistente à Vancomicina e teicoplanina
<i>K. pneumoniae</i> Isolado Clínico UQ (S)	+	Resistente à Ampicilina
<i>K. pneumoniae</i> EB012 (R)	+	Resistente a Amoxicilina/Ácido clavulânico, Ampicilina, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxime, Ciprofloxacina e Imipenem

Ao longo do período de indução, efetuado de acordo com o protocolo descrito, foi avaliada a suscetibilidade das estirpes ao H₂O₂, por microdiluição. No caso das leveduras, apresentam-se os resultados após 30 e 60 dias de indução na presença de diferentes concentrações de H₂O₂. (Tabela 10).

Tabela 10 - Determinação da MIC ao H₂O₂ nos dias 0, 30 e 60, para leveduras.

Estirpe	Condição	0 dias	30 dias	60 dias
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231	C+	0,014%	0,014%	0,014%
	½ MIC		0,014%	0,014%
	MIC		0,014%	0,028%
	2 MIC		0,014%	0,028%
<i>C. albicans</i> ATCC® 90028	C+	0,014%	0,014%	0,014%
	½ MIC		0,014%	0,028%
	MIC		0,014%	0,028%
	2 MIC		0,014%	0,028%

<i>C. auris</i> DSMZ 21092	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,014% 	0,014% 0,014% 0,014% 0,014%	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%
<i>C. auris</i> NCPF 8971	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,014% 	0,028% 0,028% 0,028% 0,028%	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%
<i>C. auris</i> NCPF 8977	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,014% 	0,014% 0,014% 0,014% 0,014%	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%

Do mesmo modo, para as bactérias foi realizada a avaliação da suscetibilidade ao H₂O₂ (Tabela 11). No entanto, de momento só foi possível fazer a indução até ao dia 20 e obter os resultados da microdiluição. O procedimento experimental ainda está a decorrer atingindo-se em breve o dia 30 de indução de resistência com o H₂O₂. Além disso, algumas das condições para as bactérias ainda não foram avaliadas aos 20 dias devido a contaminações nas amostras.

Tabela 11 - Determinação da MIC ao H₂O₂ nos dias 0 e 20 para bactérias.

Estirpe	Condição	0 dias	20 dias
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213™ (S)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056% 	0,056% 0,056% Não disponível 0,056%
<i>S. aureus</i> ATCC® 43300™ (R)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056% 	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853™ (S)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056% 	0,056% Não disponível 0,056% 0,056%

<i>P. aeruginosa</i> PS023 (R)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056%	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%
<i>E. faecium</i> Isolado Clínico UQ (S)	C+ $\frac{1}{16}$ MIC $\frac{1}{32}$ MIC $\frac{1}{64}$ MIC	0,056%	0,056% 0,056% 0,056%
<i>E. faecium</i> ATCC® 700221™ (R)	C+ $\frac{1}{16}$ MIC $\frac{1}{32}$ MIC $\frac{1}{64}$ MIC	0,056%	0,056% Não disponível 0,056% 0,056%
<i>K. pneumoniae</i> Isolado Clínico UQ (S)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056%	0,056% 0,056% 0,056% 0,056%
<i>K. pneumoniae</i> EB012 (R)	C+ ½ MIC MIC 2 MIC	0,056%	0,056% Não disponível 0,056% 0,056%

Ao longo do protocolo de indução de resistência, as bactérias são repicadas em meio de cultura sólido para controlo de contaminações. Na estirpe *P. aeruginosa* ATCC® 27853 (S) foi possível detetar alterações macroscópicas na morfologia das colónias no seu padrão de crescimento, por diminuição do efeito raiado em relação proporcional com a concentração de H₂O₂ (Figura 7).

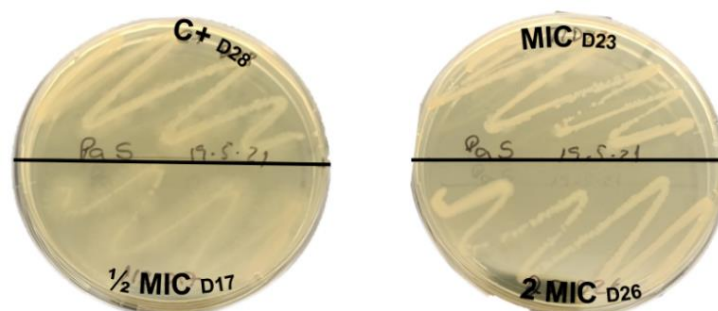


Figura 7 - Alterações macroscópicas causadas pela ação sistemática do H₂O₂.

5.3. Análise quantitativa e qualitativa de isolados ambientais durante o ciclo de limpeza e desinfecção

Numa recolha realizada a 19 de abril de 2021 (representativa) foi possível contar 1196 CFUs nas superfícies dos espaços, das quais 85% foram isoladas do quarto do doente (Figura 8-a). Foi também analisado cada espaço de acordo com o estado de limpeza (Figura 8-b), sendo que o quarto antes da limpeza corresponde ao maior número de CFUs isoladas; no entanto, mesmo após a limpeza manual verificou-se a presença de um número elevado de microrganismos – 25% do número de CFUs totais. De notar que o bloco operatório conta com 11% de CFUs totais.

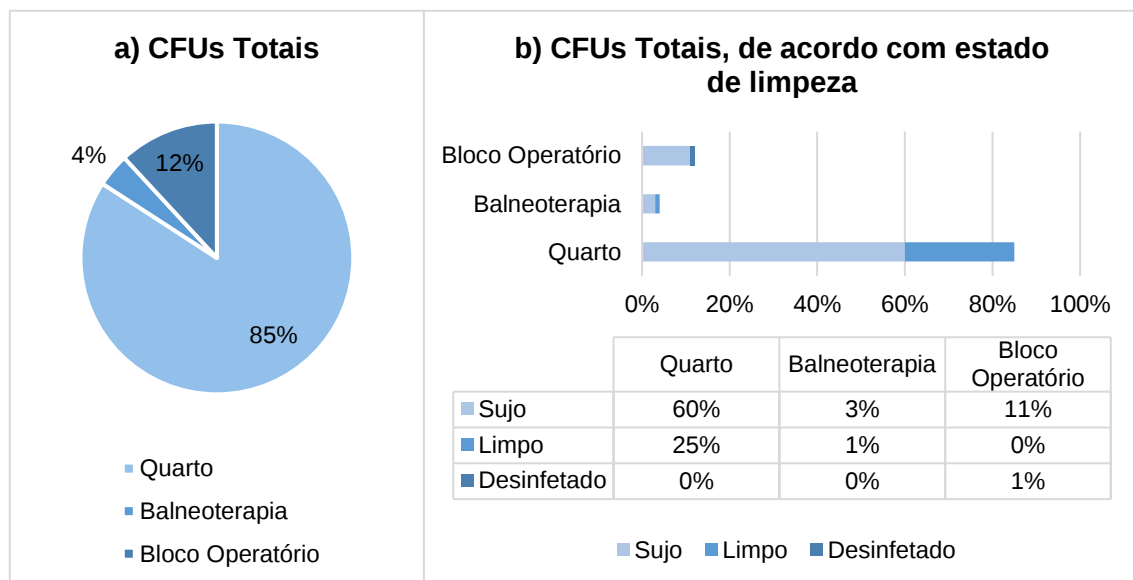


Figura 8 - Análise global de CFU da recolha-exemplo. a) Percentagem de CFUs encontradas em cada espaço, por CFUs totais; b) Percentagem de CFUs por espaço e de acordo com o estado de limpeza.

Distinguindo a percentagem de bactérias de acordo com a coloração de *Gram* (Figura 9) verifica-se uma maioria (82%) de bactérias *Gram*-positivas, corroborando com a elevada presença de *Staphylococcus spp.*, correspondentes a 64% da amostra; sendo os mais comuns *Staphylococcus hominis* (66%) e *Staphylococcus epidermidis* (30%; Figura 10)

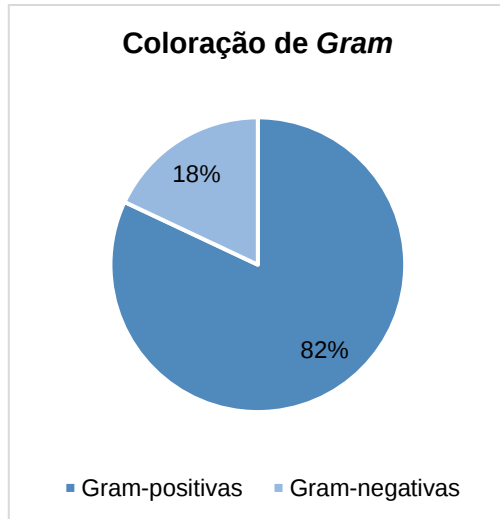


Figura 9 - Distinção das bactérias encontradas de acordo com a coloração de Gram.

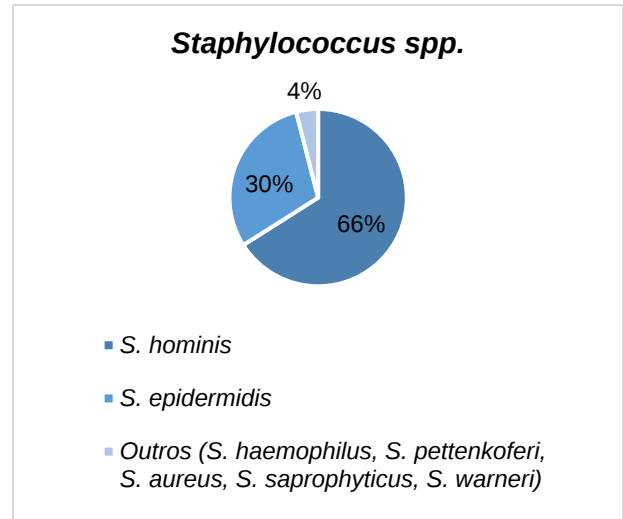


Figura 10 - Espécies de *Staphylococcus spp.* encontradas.

Em concreto, nas superfícies do quarto do doente em que se realizou a recolha destaca-se a diferença de CFUs entre sujo e limpo (Figura 11). 71% das amostras correspondem ao período pré-limpeza e os microrganismos mais presentes foram *S. hominis*, *S. epidermidis* e *Acinetobacter johnsonii* (Figura 12-a). No período pós-limpeza, foram encontrados ainda *S. hominis* e um elevado número de amostras não identificadas (Figura 12-b).

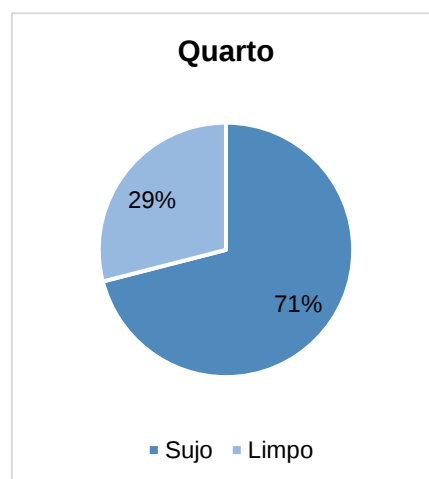


Figura 11 - Percentagem de CFUs encontradas no quarto de acordo com o estado de limpeza.

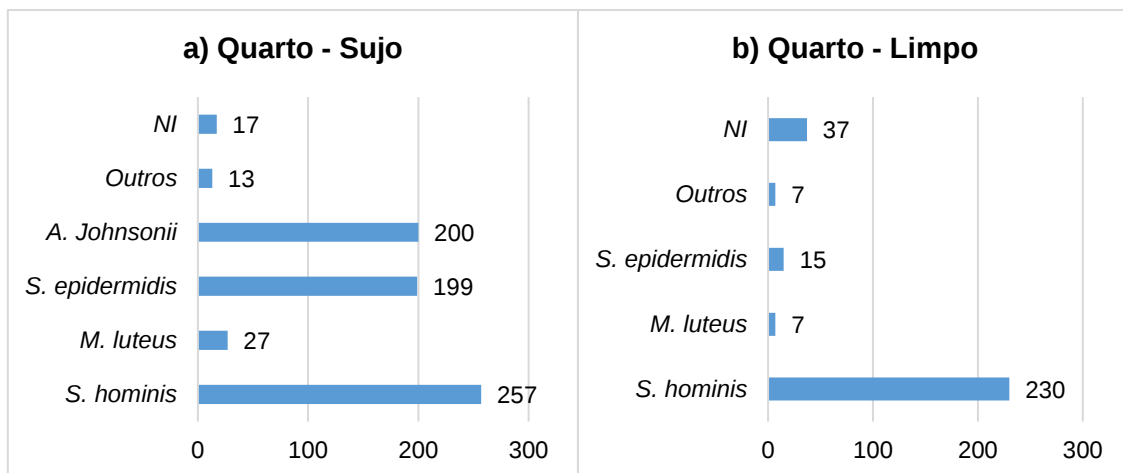


Figura 12 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no quarto. a) Sujo; b) Limpo.

Na sala de balneoterapia, 81% das amostras foram isoladas na fase suja (Figura 13) e correspondem essencialmente a *S. epidermidis* e *Staphylococcus warneri* (Figura 14-a). Já, após a limpeza foram encontrados outros microrganismos: *Pseudomonas putida* e *S. hominis* (Figura 14-b).

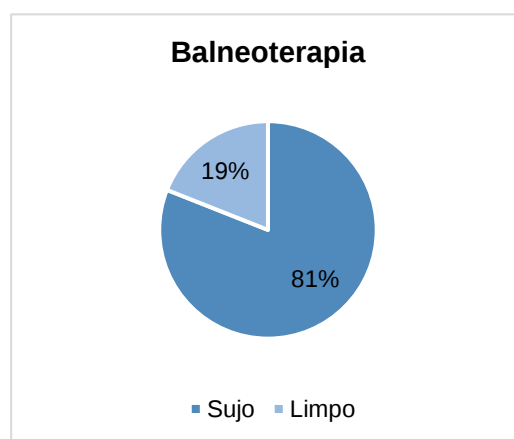


Figura 13 - Percentagem de CFUs encontradas na sala de balneoterapia de acordo com o estado de limpeza.

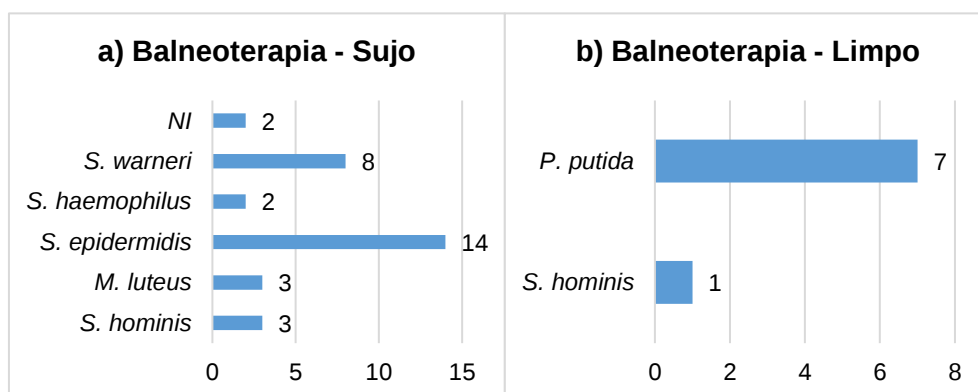


Figura 14 - Microrganismos encontrados, em CFUs, na sala de balneoterapia. a) Sujo; b) Limpo.

Do mesmo modo, para as superfícies do bloco operatório, na fase pré-limpeza, que corresponde a 94% das amostras (Figura 15), o microrganismo mais comum foi o *Micrococcus luteus* (Figura 16-a). Entre o período de pós-limpeza e pós-desinfecção, foi possível contar, ainda que em baixa percentagem (4%), maior número de CFUs após a desinfecção e de salientar que o microrganismo encontrado foi o *S. warneri* (Figuras 16-b e 16-c).

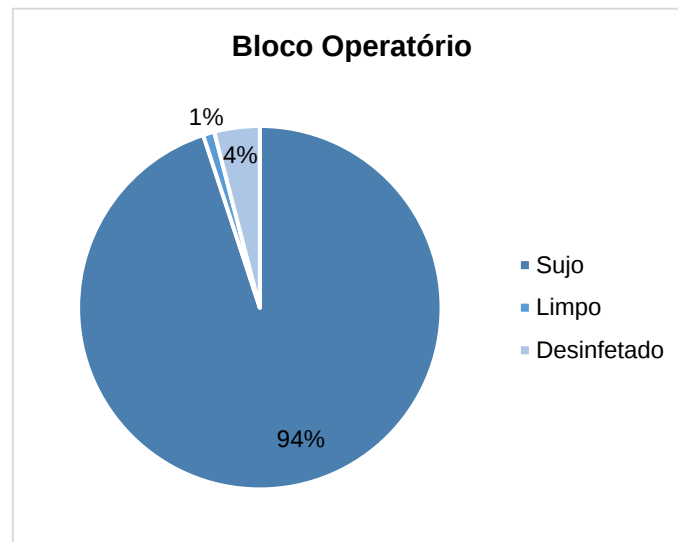


Figura 15 - Percentagem de CFUs encontradas no bloco operatório de acordo com o estado de limpeza.

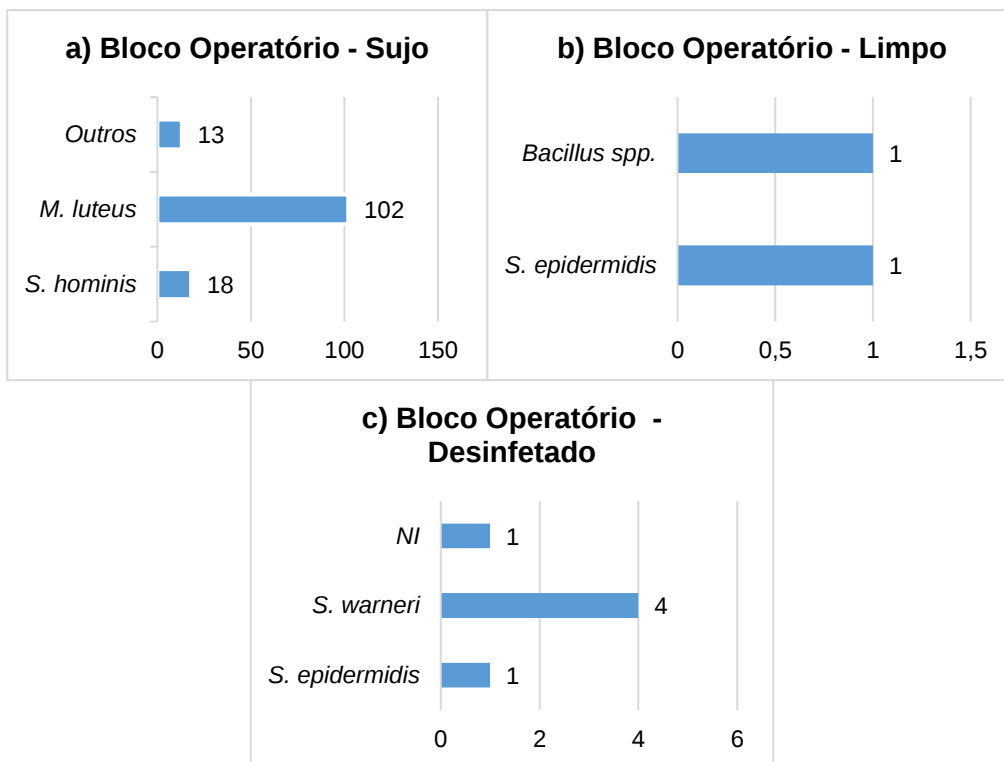


Figura 16 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no bloco operatório. a) Sujo; b) Limpo; c) Desinfetado.

Em termos de pontos de recolha em cada espaço, encontram-se nas figuras 17 a 19, o número de CFUs presentes de acordo com o estado de limpeza. No quarto, os locais mais colonizados foram o colchão (meio), o painel de controlo, o monitor de ventilação e a *bed-rail* (Figura 17). De salientar que a *bed-rail* se encontrava mais colonizada após a limpeza manual. Na sala de balneoterapia, o local com maior número de CFUs foi o chão e o interruptor da luz (Figura 18). No bloco operatório, o ponto mais colonizado foi o interruptor da luz (Figura 19).

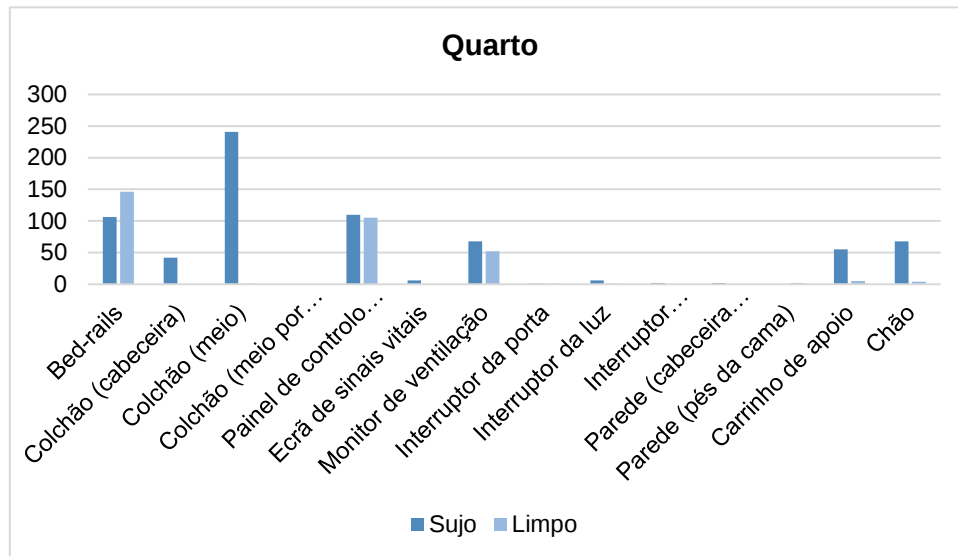


Figura 17 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha do quarto.

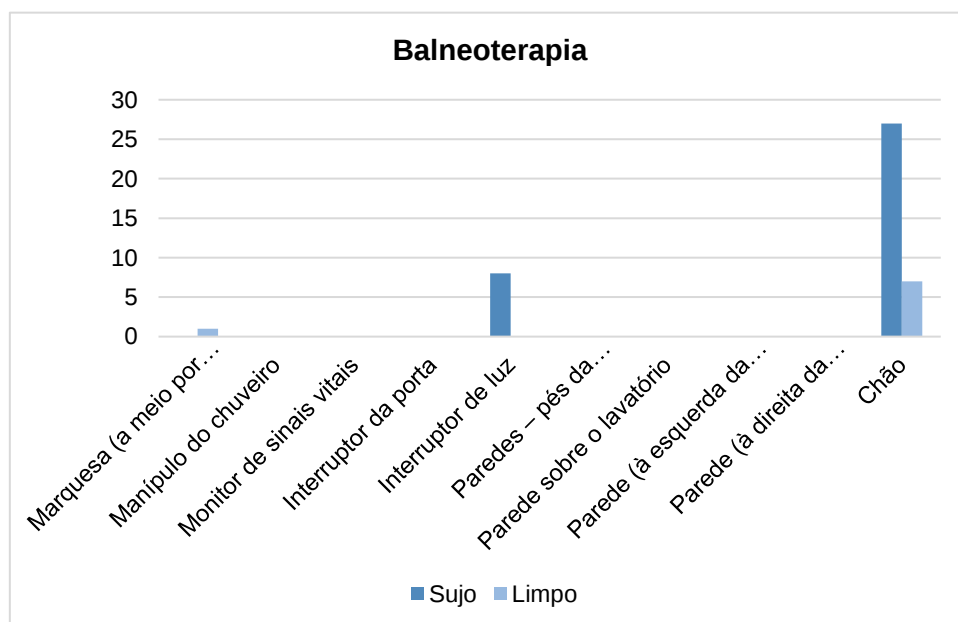


Figura 18 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha da sala de balneoterapia.

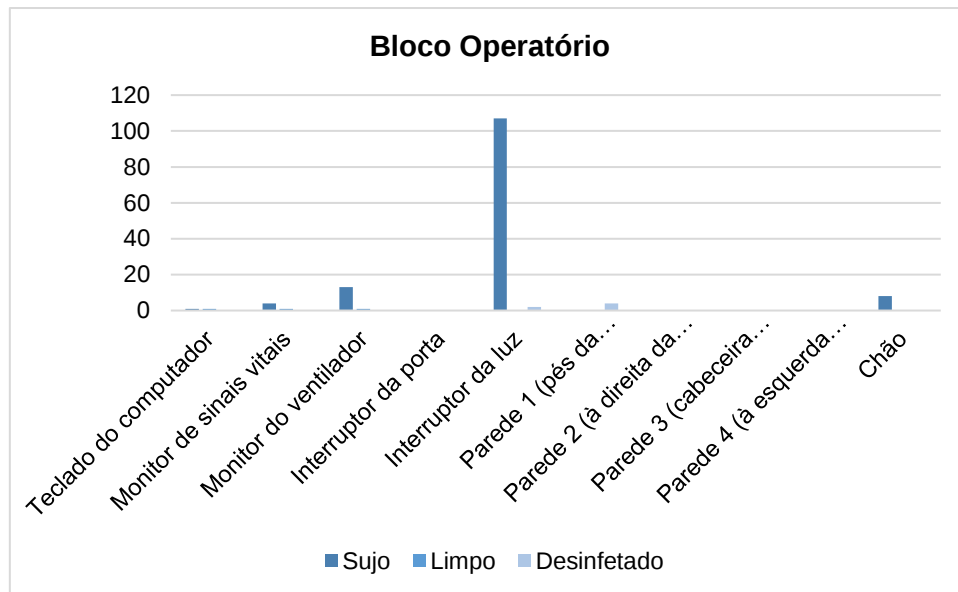


Figura 19 - Contagem de CFUs nos pontos de recolha do bloco operatório.

Relativamente às amostras recolhidas do ar dos espaços, tal como nas superfícies, o espaço mais colonizado foi o quarto (Figura 20). De notar que na sala de balneoterapia não foi detetado nenhum microrganismo.

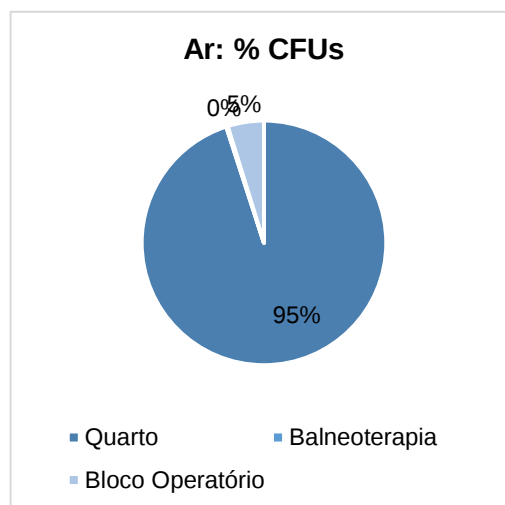


Figura 20 - Percentagem de CFUs recolhidas do ar em cada espaço, por CFUs totais do ar.

Nas amostras obtidas do ar do quarto verifica-se uma elevada percentagem correspondente à fase pré-limpeza (Figura 21), sendo que o microrganismo mais frequente foi o *S. hominis* (Figura 22-a). Já na fase pós-limpeza, o microrganismo mais presente foi o *M. luteus* (Figura 22-b), ainda assim existe uma elevada percentagem de microrganismo não identificados.

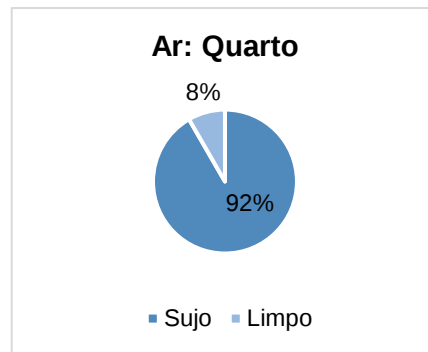


Figura 21 - Percentagem de CFUs encontradas no ar do quarto de acordo com o estado de limpeza.

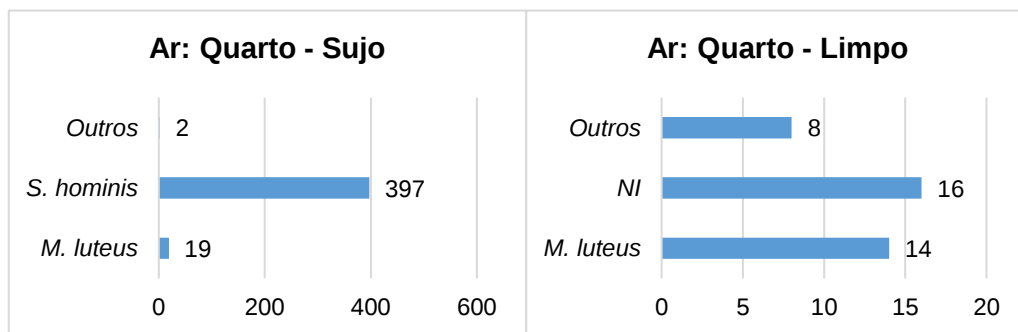


Figura 22 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no ar do quarto. a) Sujo; b) Limpo.

Nas amostras obtidas do ar do bloco operatório, em discordância com os resultados anteriores, o ambiente limpo corresponde ao maior número de CFUs – 87% (Figura 23). Os microrganismos mais frequentes foram *S. epidermidis* e *M. luteus* (Figura 24).

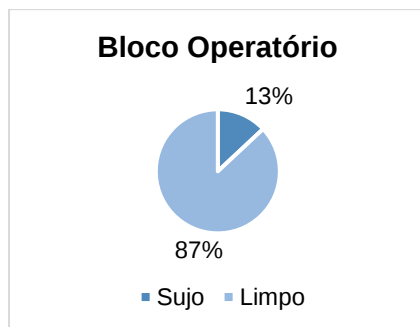


Figura 23 - Percentagem de CFUs encontradas no bloco operatório de acordo com o estado de limpeza.

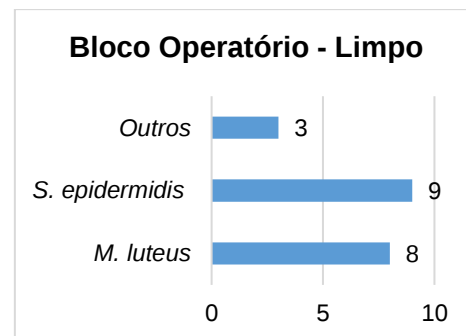


Figura 24 - Microrganismos encontrados, em CFUs, no ar do bloco operatório, após a limpeza manual.

Nesta recolha não foram isoladas leveduras, seja em placas de BH e DG18 nem fungos filamentosos, visto que não se verificou crescimento nas placas de DG18.

6. Discussão

Tendo como objetivo a utilização de um biocida em vapor seco para desinfecção de superfícies num período reduzido, surge o projeto “Impacto da nebulização seca de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ag}^+$ na infeção associada a cuidados de saúde: o paradigma da Unidade de Queimados”.

A desinfecção dos espaços hospitalares é essencial; em especial nas UCIs, onde se encontram doentes muito debilitados [52], o que permite evitar as IACS, responsáveis pela alta mortalidade e custos hospitalares elevados [51]. Além disso, a disseminação destas infeções agrava a problemática da resistência aos antimicrobianos [52]. Ainda assim, a desinfecção manual não apresenta eficácia suficiente na remoção dos microrganismos das superfícies, que, por consequência, tornam-se no veículo de transmissão de infeções [51]. Surge a urgência no desenvolvimento de metodologias eficazes, como o caso do peróxido de hidrogénio.

O H_2O_2 é atualmente utilizado como método de desinfecção, no entanto os ciclos de desinfecção são longos e, por consequência, o tempo necessário para a utilização do quarto novamente é longo, ou seja, o tempo necessário à decomposição do H_2O_2 [56]. Assim surgiu a discussão da redução do tempo de desinfecção, mantendo ou melhorando a eficácia antimicrobiana. O assunto foi discutido e testado previamente pela equipa de investigação responsável pelo projeto no artigo intitulado “*Fast cycle H_2O_2 nebulisation against frequent healthcare-associated microorganisms efficacy assessment*” [60].

Foram avaliados dois ciclos de desinfecção em material presentes em ambiente hospitalar, inoculados com estirpes comuns no ambiente descrito. No ciclo padrão, usado atualmente, a solução HyPro Technical 7% foi vaporizado durante 8 minutos em 35 m^3 e o local foi deixado em repouso por 1 hora. No ciclo rápido, num volume de 5 m^3 , a vaporização tem duração de 2 minutos com repouso de 15 minutos. Por fim, foi avaliada a eficácia dos dois ciclos de desinfecção, verificando-se que ambos os ciclos são capazes de efetuar uma desinfecção eficaz contra os microrganismos testados (independentemente do seu perfil de suscetibilidade a outros antimicrobianos), com especial destaque para o ciclo rápido, que apresentou uma eficácia entre 84,4% ($\pm 17,0\%$) e 95,7% ($\pm 10,5\%$) [60].

Além da demonstração de eficácia de um ciclo rápido de desinfecção, foi possível estudar a adesão das células às superfícies referidas. No procedimento

experimental é descrita a distribuição de um pequeno volume de inóculo em cada material. Após o ciclo de desinfecção, foi realizada uma análise quantitativa dos microrganismos que permite, além do estudo da eficácia dos ciclos de desinfecção, saber se há propensão para o desenvolvimento posterior de biofilme. Desta forma, este ensaio tem como objetivo mimetizar o momento em que uma gotícula é expelida por um indivíduo potenciando a colonização numa superfície por microrganismos e posterior formação de biofilme [60].

Sabendo assim a eficácia de um ciclo mais curto de desinfecção é essencial avaliar o efeito antimicrobiano do H_2O_2 *in vitro* por mimetismo do ambiente hospitalar, devido às peculiaridades existentes, como o caso do crescimento em biofilme. Tanto em superfícies como no organismo humano, as células bacterianas em proliferação tendem a organizar-se em biofilme, de forma a perseverarem em ambientes inóspitos, através de relações simbióticas entre elas [53]. Nestes casos, a desinfecção torna-se mais difícil e por isso a metodologia aplicada deve ser refinada. De forma a avaliar o efeito antimicrobiano do H_2O_2 realizou-se o ensaio para determinar a quantidade e viabilidade celular de células em biofilme, após a desinfecção.

Foram testados dois ciclos de desinfecção, um deles o usado atualmente e o segundo, o ciclo rápido, descrito previamente. A desinfecção foi avaliada por dois ensaios: CV e XTT. Pelo ensaio do CV é possível marcar células aderidas e desta forma determinar a quantidade de células em biofilme, por espectrofotometria [57,58]. Este ensaio permite obter informação relativa à eficácia da exposição ao H_2O_2 na redução dos biofilmes. Como exemplo deste teste foram apresentados dados relativos a um ensaio com a estirpe *A. baumannii* ATCC® 19606™. Esta bactéria é conhecida pela sua propensão para o desenvolvimento de infeções associadas aos cuidados de saúde, devido à sua capacidade de crescimento em biofilme em superfícies hospitalares [61].

Os resultados obtidos neste ensaio do CV pela forma isolada pela qual foram descritos não são elucidativos sobre qual o ciclo de desinfecção mais adequado. Para a fórmica e napa seria o CN e para o inox, linóleo e PVC o CM; ainda assim estes resultados não são congruentes com os valores obtidos pelos controlos. Este ensaio possui várias peculiaridades no seu procedimento que tornam dados isolados mais complexos de analisar.

No caso do ensaio do XTT é possível determinar a viabilidade celular, por redução do XTT a um composto com cor laranja em células viáveis, que é passível de

quantificar por espectrofotometria [57,58]. Cita-se como exemplo, um dos ensaios do teste do XTT onde foi usada a estirpe *K. pneumoniae* ATCC® 70063™, responsável por várias IACS [62]. Também os resultados obtidos neste ensaio individual não são elucidativos face ao melhor ciclo de desinfecção, visto que os controlos negativos apresentaram, por vezes, os valores elevados de absorbância. Este tipo de ensaio é delicado visto que facilmente são libertados resíduos que interferem na leitura espectrofotométrica, daí os valores do controlo negativo serem por vezes superiores.

Ambos os ensaios descritos para quantificação e viabilidade celular são essenciais para entender desenvolvimento dos biofilmes e a possibilidade de sobrevivência do mesmo após a desinfecção. De salientar a necessidade de análise da totalidade dos ensaios de acordo com a significância estatística para que seja possível obter resultados fidedignos e passíveis de identificar o ciclo de desinfecção mais eficaz.

Estando as células organizadas em biofilme possuem diversas alterações responsáveis pela sua sobrevivência, como é o caso da sua propensão para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos [53]. Além disso, nas UCIs verifica-se um elevado número de microrganismos multirresistentes [52].

Deste modo, é essencial avaliar o possível efeito indutor de resistência ao H_2O_2 . Para tal foi determinado inicialmente a MIC das bactérias e leveduras em estudo, para, a partir, desse valor, sujeitar os microrganismos a concentrações toleráveis do biocida ao longo de um período de tempo, como seria expectável, por exemplo, em superfícies hospitalares desinfetadas frequentemente. Em intervalos de tempo pré-definidos foi avaliada a suscetibilidade das bactérias e leveduras ao H_2O_2 .

Como referido, as estirpes de leveduras e bactérias foram selecionadas de acordo com o seu potencial clínico e tendo por base a sua suscetibilidade aos antimicrobianos, de forma que fosse possível uma avaliação mais abrangente dos microrganismos.

No caso das leveduras, das espécies *C. albicans* e *C. auris*, após a indução até aos 30 e 60 dias não se verificou indução de resistência ao H_2O_2 . A diferença de uma diluição não deve ser considerada como significativa. No caso das *C. auris* DSMZ 210092 e *C. auris* NCPF 8977, verificou-se a diferença de duas diluições após os 60 dias. Para a *C. auris* NCPF 8971, a variação de MIC entre os vários é de 1 diluição a cada 30 dias. Apesar de não ser ideal, esta alteração não deve ser considerada

significativa no âmbito clínico, visto que o ensaio decorreu sobre elevada pressão seletiva do biocida, a qual não se verifica em ambiente hospitalar.

Este resultado, apesar de simples é bastante importante pois permite a utilização deste biocida sem a necessidade de preocupações relativas ao desenvolvimento de mecanismos de resistência.

Nas bactérias, das espécies *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *K. pneumoniae*, após a indução até aos 20 dias também não se verificou indução de resistência. Este resultado corrobora com o resultado obtida para as leveduras. De notar que a indução das bactérias decorrerá também até aos 60 dias. De salientar ainda as alterações fenotípicas possíveis de identificar nas bactérias devido à ação do H_2O_2 . Por exemplo, no caso da *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ (S) verifica-se a diminuição do fenótipo raiado no crescimento em agar. Sendo que a mesma foi identificada por MALDI-TOF, de forma a comprovar não se tratar de contaminação cruzada. No futuro seria interessante entender o fenómeno capaz de provocar estas alterações morfológicas, dado que o mecanismo biocida do H_2O_2 ainda não se encontra completamente compreendido [63].

De salientar o resultado do teste da catalase para as estirpes de *E. faecium*, uma vez que a presença de catalase está associada ao aumento de tolerância dos microrganismos ao H_2O_2 [54]. Para estas estirpes, o resultado negativo corrobora com as concentrações inferiores de H_2O_2 utilizadas, visto que não possuem a mesma tolerância para o biocida como as restantes estirpes. Em termos de perfil de suscetibilidade, no caso das bactérias em estudo não se verifica diferenças na MIC entre bactérias resistentes e suscetíveis; no entanto, será interessante futuramente confirmar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos.

A par da informação descrita é fundamental avaliar o ciclo rápido de desinfeção em ambiente hospitalar; neste caso, a UQ do CHUSJ. Para tal foi realizada uma análise qualitativa e quantitativa de isolados ambientais em três momentos de limpeza: antes da limpeza manual, após a limpeza manual e após a desinfeção com o ciclo rápido.

Na recolha usada como exemplo neste relatório foram contadas 1196 CFUs, maioritariamente pertencentes ao quarto do doente, como esperado. Este local é visitado por vários profissionais de saúde, umas das principais vias de transmissão.

Além disso, muitos dos doentes possuem feridas, que funcionam como depósitos bacterianos [51,53].

Analisando os espaços de acordo com o seu estado de limpeza, o quarto antes da limpeza foi o que apresentou maior carga bacteriana. Porém, após a limpeza, a percentagem de microrganismos, apesar de diminuir, manteve-se elevada. Este resultado indica-nos que a limpeza manual não foi eficaz na remoção dos microrganismos deste espaço. De salientar ainda que no bloco operatório, previamente à limpeza, foram encontrados microrganismos, contrariamente ao esperado, visto que este espaço é reconhecido devido ao seu elevado grau de assepsia.

Posteriormente à análise global de CFUs, as amostras foram identificadas por MALDI-TOF. Associada a laboratórios de microbiologia, esta técnica tem-se tornado cada vez mais usual na identificação de microrganismos devido à sua rapidez e eficiência. As amostras são facilmente preparadas; no entanto, por vezes pode ser necessário recorrer a processos de extração. De salientar que a identificação é realizada por análise do perfil proteico das amostras em comparação com a base de dados associadas ao *software* do aparelho de MALDI-TOF. Amostras com perfis proteicos semelhantes podem ser identificadas erradamente, sendo esta uma das desvantagens do MALDI-TOF [64,65].

De forma global, é de notar a elevada percentagem de bactérias *Gram*-positivas isoladas nesta recolha. Estas bactérias são reconhecidas pela sua coloração violeta quando efetuada a coloração de *Gram*, devido à presença de uma camada de peptidoglicano, que lhes confere capacidade de resistir em ambiente inóspitos [66]. Além disso, verificou-se uma elevada presença de *Staphylococcus spp.* correspondente à forte relação destes microrganismos com infeções associadas a dispositivos médicos, como os cateteres [67]. As espécies mais encontradas foram *S. hominis* e *S. epidermidis*. O *S. hominis* é frequentemente isolado no contexto hospitalar e reconhecido como um microrganismo oportunista [67]. O *S. epidermidis* é essencialmente conhecido pela sua capacidade de crescimento em biofilme, a qual lhe confere resistência aos antibióticos [66].

Em termos das superfícies do quarto, como seria de esperar, o período pré-limpeza é que corresponde ao maior número de CFUs. Os microrganismos mais presentes foram *S. hominis*, *S. epidermidis* e *A. johnsonii*. O *A. johnsonii* é responsável infeções graves. No entanto, o maior problema deste microrganismos

passa pela sua capacidade de reserva de genes de resistência, que, por transferência horizontal, é capaz de transferir para outras estirpes, não desejável em ambiente hospitalar [68].

Mesmo após a limpeza foram isolados ainda *S. hominis* indicando que a limpeza não terá sido eficaz na remoção total dos microrganismos, promovendo a transmissão microbiana. De salientar ainda que um elevado número de amostras ainda não se encontra identificada, sendo a identificação essencial para a caracterização microbiana do espaço e para identificar os possíveis microrganismos mais difíceis de remover. A tentativa de identificação é repetida, por, pelo menos, três vezes. Em alguns casos, recorre-se à adição de Ácido Fórmico, como extração simples, ou por extração complexa com Ácido Trifluoroacético; ambas apropriadas para leitura por MALDI-TOF.

Na sala de balneoterapia, assim como no quarto, a maioria das amostras foram encontradas no momento pré-limpeza, correspondendo na sua maioria a *S. epidermidis* e *S. warneri*. O *S. warneri*, apesar de não possuir elevada capacidade de desenvolver biofilme (contrariamente ao *S. epidermidis*) e raramente ser patogénico, é capaz de causar de infeções em doentes imunossuprimidos [69], como é o caso dos doentes da UQ do CHUSJ. De salientar ainda, que após a limpeza os microrganismos isolados foram diferentes (*P. putida* e *S. hominis*) levando a crer que decorra algum fenómeno de disseminação bacteriana entre espaços.

Por fim, e do mesmo modo, nas superfícies do bloco operatório, a fase pré-limpeza corresponde ao maior número de CFUs e o microrganismo mais comum foi o *M. luteus*, responsável por várias infeções em doentes imunossuprimidos [70]. De notar que 4% das CFUs deste espaço correspondem ao período pós-desinfecção. Estes microrganismos foram essencialmente isolados do interruptor da luz e da parede aos pés da marquesa. Principalmente o interruptor, é um local de frequente contacto, por essa razão poderá ser necessária uma desinfecção mais eficaz. Os restantes pontos de recolha mais colonizados em cada espaço foram também locais identificados com elevado contacto pelos profissionais de saúde.

Relativamente às amostras recolhidas do ar dos espaços, tal como nas superfícies, o espaço mais colonizado foi o quarto e no período pré-limpeza, como esperado. Os microrganismos mais comuns foram o *S. hominis*, na fase suja, e o *M. luteus*, na fase limpa. De salientar que não foram encontradas CFUs na sala de balneoterapia. No entanto, no bloco operatório, a maioria das amostras correspondiam

à fase limpa. Esta carga bacteriana presente neste espaço é preocupante, pois seria expectável uma desinfecção total, visto que neste local decorrem as cirurgias nas quais os doentes se encontram frequentemente em imunossupressão.

Na recolha utilizada como exemplo não se verificou crescimento de fungos, sejam leveduras ou fungos filamentosos. No entanto, noutras recolhas já foi possível isolar *C. albicans* e *C. parapsilosis*, assim como *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, identificados por microscopia. O *Aspergillus spp.* está associado a infeções pulmonares, essencialmente devido à exposição dos conídios. Além disso, está associado a infeções pós-operatórias devido à colonização por esporos em feridas, via aérea ou pelo contacto direto [71]. No caso do *Penicillium spp.*, além da sua utilização na produção de antibióticos, também é capaz de causar infeção em doentes imunossuprimidos, por inalação ou contacto direto [72].

De destacar que os dados apresentados correspondem a um exemplo de recolha; no entanto, as restantes recolhas que acompanhei ao longo do período de estágio apresentam padrões semelhantes com pequenas alterações percentuais.

Portanto, a inspeção da carga microbiana nos ambientes aos quais se pretende implementar ciclos rápidos de desinfecção é essencial para entender quais os locais mais colonizados, quais os microrganismos mais comuns e quais os pontos de difícil desinfecção, de forma que a aplicação do método seja eficiente. Ademais, com a recolha dos isolados ambientais e das amostras biológicas disponibilizadas, brevemente será possível a análise genotípica e determinar as possíveis relações estabelecidas entre elas.

Concluindo, a avaliação e otimização deste ciclo mais rápido de desinfecção é de extrema importância clínica, de forma a evitar a transmissão cruzada de microrganismos multirresistentes, principalmente, em UCIs. Além disso, será possível mitigar a emergência de resistências aos antibióticos, sendo estes cruciais para a dinâmica hospitalar.

Rotina em laboratório de microbiologia

No âmbito da minha inserção no serviço e laboratório de microbiologia da FMUP, tive ainda a oportunidade de desenvolver experiência na rotina laboratorial. Neste sentido, pude aplicar as diferentes metodologias associadas à área da microbiologia.

O laboratório realiza a prestação de serviços externos no âmbito dos TSA. Sempre que requerido, principalmente pelo CHUSJ, realizamos avaliação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos por microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo do CLSI M27-A3S4 para leveduras [59] e/ou EUCAST [73] para *Candidas spp.*. Os resultados da suscetibilidade são depois entregues e permitem ao médico prescrever a terapêutica indicada ao seu doente. Este tipo de parceria é uma mais-valia para que a academia se torne útil no dia-a-dia da clínica.

À parte disso, participo na preparação das aulas de microbiologia dos alunos de mestrado integrado em Medicina nas diferentes áreas de estudo. Esta tarefa permitiu-me familiarizar-me com técnicas de identificação macro e microscópica de bactérias e fungos (leveduras e fungos filamentosos).

De salientar ainda que no decorrer do estágio tive a oportunidade de fortalecer a minha rede de contactos, o que se deveu à possibilidade de trabalhar em equipas multidisciplinares e num ambiente de melhoria contínua.

Conclusão

A realização deste estágio em contexto empresarial, e em parte académico, teve como mote o estudo do doseamento microbiológico de antibióticos por citometria de fluxo. Esta metodologia apresenta uma nova visão da medicina personalizada. Desta forma será possível a otimização das dosagens de antibiótico administradas aos doentes, principalmente aqueles com morbididades associadas; sendo esta uma terapêutica mais dirigida.

Como o estágio me oferece a possibilidade de aplicação de conhecimentos científicos e desenvolvimento de competências profissionais, surgiu a oportunidade de expandir o meu conhecimento participando num projeto a decorrer na FMUP. Neste projeto, em que se pretende comprovar a eficiência de um ciclo mais curto de desinfecção por H_2O_2 em ambiente hospitalar, de forma a evitar a transmissão cruzada de microrganismos, fui capaz de colocar à prova as minhas capacidades científicas e adquirir uma vasta experiência numa equipa multidisciplinar.

Tendo como linha condutora as aplicações biotecnológicas na prevenção de infeções e das resistências aos antimicrobianos, posso garantir que possuo conhecimento e também ferramentas passíveis de ajudar a saúde pública e hospitalar no que diz respeito a infeções causadas por leveduras e bactérias. Desta forma, a biotecnologia, em especial a medicinal, pode tornar-se uma aliada nesta temática.

Em suma, o desenvolvimento do trabalho experimental e deste relatório foi apenas o começo, para mim, do que é uma longa discussão científica na área da microbiologia.

Referências Bibliográficas

1. Nações Unidas. Objetivos para o desenvolvimento sustentável e o BCSD Portugal [Internet]. Portugal: Conselho Empresarial para o Desenvolvimento Sustentável; 2021. Disponível em: <https://www.ods.pt/>
2. FASTinov. Fast susceptibility testing for acute care directly from positive blood cultures [Internet]. Portugal: FASTinov; 2016. Disponível em: <http://www.fastinov.com/>
3. World Health Organization. Antibiotic resistance [Internet]. Suíça: World Health Organization; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
4. European Commission. A European one health action plan against AMR. Luxemburgo: European Commission; 2017. 21. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network [Internet]. Estocolmo: ECDC Surveill Rep. 2017. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>
6. Frost I, Laxminarayan R, McKenna N e Chai S. Antimicrobial resistance and primary health care. Suíça: World Health Organization; 2018. 12. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/primary-health-care-conference/amr.pdf?sfvrsn=8817d5ba_2
7. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. Thorax. 2012; 67(1):71–9. Disponível em: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thx.2009.129502>
8. Lee Ventola. The antibiotic resistance crisis - causes and threats. P&T. 2015; 40(4):277–83.
9. Moser C, Lerche CJ, Thomsen K, Hartvig T, Schierbeck J, Jensen P, et al.

- Antibiotic therapy as personalized medicine – general considerations and complicating factors. APMIS. 2019;127(5):361–71. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.12951>
10. Scerbo MH, Kaplan HB, Dua A, Litwin DB, Ambrose CG, Moore LJ, et al. Beyond blood culture and gram stain analysis: A review of molecular techniques for the early detection of bacteremia in surgical patients. Surg Infect (Larchmt). 2016;17(3):294–302.
Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/sur.2015.099>
 11. Shankar Pr. Tackling drug-resistant infections globally. Arch Pharm Pract. 2016;7(3):110.
Disponível em: <http://www.archivepp.com/text.asp?2016/7/3/110/186181>
 12. Kulathunga DGRS, Rubin JE. A review of the current state of antimicrobial susceptibility test methods for *Brachyspira*. Can J Microbiol. 2017;63(6):465–74.
Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2016-0756>
 13. Syal K, Mo M, Yu H, Iriya R, Jing W, Guodong S, et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. Theranostics. 2017;7(7):1795–805.
Disponível em: <http://www.thno.org/v07p1795.htm>
 14. Rodríguez-Baño J, Rossolini GM, Schultsz C, Tacconelli E, Murthy S, Ohmagari N, et al. Antimicrobial resistance research in a post-pandemic world: Insights on antimicrobial resistance research in the COVID-19 pandemic. J Glob Antimicrob Resist. 2021;25(Janeiro):5–7.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221371652100045X>
 15. Lucien MAB, Canarie MF, Kilgore PE, Jean-Denis G, Fénélon N, Pierre M, et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. Int J Infect Dis. 2021;104 (Janeiro):250–4.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221000163>
 16. Ghosh S, Bornman C, Zafer MM. Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand?. J Infect Public Health. 2021;14(5):555–60.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876034121000551>
 17. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck C. Basic

laboratory procedures in clinical bacteriology. 2ª edição. Suíça: World Health Organization; 2003.

18. van Belkum A, Dunne WM. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2018–24.
Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/51/7/2018>
19. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States Perspective. Clin Microbiol Rev. 2016; 29(3):525–52.
Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27076637>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4861989>
20. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. Identification and antibiotic-susceptibility profiling of infectious bacterial agents: A review of current and future trends. Biotechnol J. 2019;14(1):1700750. Disponível em:
<http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201700750>
21. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009; 49(11):1749–55. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>
22. Lallemand EA, Lacroix MZ, Toutain P-L, Boullier S, Ferran AA, Bousquet-Melou A. In vitro degradation of antimicrobials during use of broth microdilution method can increase the measured minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations. Front Microbiol. 2016;7(Dezembro):2–7. Disponível em:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02051/full>
23. Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial stewardship: how the microbiology laboratory can right the ship. Clin Microbiol Rev. 2017;30(1):381–407. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/30/1/381>
24. Pina-Vaz C, Rodrigues A, Antunes I, Santos R, Morais, AS, Silva A. Kit and method of detecting the resistant microorganisms to a therapeutic agent. WO2012164547A1.

25. Aebisher D, Bartusik D, Tabarkiewicz J. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:434–43.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.048>
26. Ambriz-Aviña V, Contreras-Garduño JA, Pedraza-Reyes M. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *Biomed Res Int.* 2014;1–14. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/461941/>
27. Markossian, Sarine; Sittampalam, G. Sitta; Grossman A et al. *Assay Guidance Manual*. Estados Unidos da América: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
28. Léonard L, Bouarab Chibane L, Ouled Bouhedda B, Degraeve P, Oulahal N. Recent advances on multi-Parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front Microbiol.* 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01225/abstract>
29. Lawry J. *Flow Cytometry. Tools and techniques in biomolecular science*. Reino Unido: Oxford University Press; 2013. p. 367–93.
30. Wang L, Hoffman RA. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2017;79(1):1.3.1-1.3.27.
Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.14>
31. Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother* 2015;21(5):319–29.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X15000379>
32. Roberts JA, Roger C, De Waele JJ. Personalized antibiotic dosing for the critically ill. *Intensive Care Med.* 2019;45(5):715–8.
Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05522-3>
33. Champion M, Scully G. Antibiotic Use in the Intensive Care Unit: Optimization and De-Escalation. *J Intensive Care Med.* 2018;33(12):647–55.
Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0885066618762747>
34. Ru Hoo GS, Liew YX, Kwa AL-H. Optimisation of antimicrobial dosing based on pharmacokinetic and pharmacodynamic principles. *Indian J Med Microbiol.* 2017;35(3):340–6.

- Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255085720303303>
35. Allison MG, Heil EL, Hayes BD. Appropriate antibiotic therapy. *Emerg Med Clin North Am.* 2017; 35(1):25–42.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733862716300645>
 36. Cheah SE, Bulitta JB, Li J, Nation RL. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for polymyxin B in bacterial growth media. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 92:177–82.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.015>
 37. Tsuji BT, Landersdorfer CB, Lenhard JR, Cheah S-E, Thamlikitkul V, Rao GG, et al. Paradoxical effect of polymyxin B: High drug exposure amplifies resistance in *Acinetobacter baumannii*. *AAC.* 2016;60(7):3913–20.
Disponível em: <https://aac.asm.org/content/60/7/3913>
 38. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *AAC.* 2009;53(8):3430–6.
 39. Abdul-Aziz MH, Lipman J, Roberts JA. Antibiotic dosing for multidrug-resistant pathogen pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(2):231–9.
Disponível em: <http://journals.lww.com/00001432-201704000-00013>
 40. Rao GG, Ly NS, Haas CE, Garonzik S, Forrest A, Bulitta JB, et al. New dosing strategies for an old antibiotic: Pharmacodynamics of front-loaded regimens of colistin at simulated pharmacokinetics in patients with kidney or liver disease. *AAC.* 2014;58(3):1381–8.
 41. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *AAC.* 2006;50(9):2946–50.
 42. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. *AAC.*

- 2009;53(8):3430–6. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/53/8/3430>
43. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *AAC*. 2011;55(7):3284–94.
Disponível em: <https://aac.asm.org/content/55/7/3284>
 44. Clinical and Laboratory Standards Institute. Polymyxin breakpoints for *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* 2008;(14106):23–7.
 45. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard, 11th ed. M07-A11. 2018.
 46. Fonseca e Silva D, Andrade FF, Gomes R, Silva-Dias A, Martins-Oliveira I, Pérez-Viso B, et al. Ultra-rapid flow cytometry assay for colistin MIC determination in *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(11): 1559.e1-1559.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20305024>
 47. Fonseca e Silva D, Silva-Dias A, Gomes R, Martins-Oliveira I, Ramos MH, Rodrigues AG, et al. Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(6):820–3.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.016>
 48. Fernandes ÂR. Avaliação da suscetibilidade da bactéria *Streptococcus pneumoniae* diretamente a partir de hemoculturas por citometria de fluxo. 2019.
 49. Roberts JA, Abdul-Aziz MH, Lipman J, Mouton JW, Vinks AA, Felton TW, et al. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(6):498–509.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309914700362>
 50. Álvarez R, López Cortés LE, Molina J, Cisneros JM, Pachón J. Optimizing the Clinical Use of Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):2601–9.
Disponível em: <https://aac.asm.org/content/60/5/2601>

51. Cobrado L, Pinto Silva A, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Effective Disinfection of a Burn Unit after Two Cases of Sepsis Caused by Multi-Drug–Resistant *Acinetobacter baumannii*. Surg Infect (Larchmt). 2018;19(5):541–3.
Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/sur.2017.311>
52. Albrich WC, Angstwurm M, Bader L, Gärtner R. Drug resistance in intensive care units. Infection. 1999;27(S2): S19–23.
Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02561665>
53. Azevedo M-M, Lisboa C, Cobrado L, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: an intricate interrelationship. Br J Nurs. 2020;29(5): S6–13. Disponível em:
<http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/bjon.2020.29.5.S6>
54. McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147–79.
55. Finnegan M, Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard J-Y. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. J Antimicrob Chemother. 2010;65(10):2108–15. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkq308>
56. Otter JA, Puchowicz M, Ryan D, Salkeld JAG, Cooper TA, Havill NL, et al. Feasibility of Routinely Using Hydrogen Peroxide Vapor to Decontaminate Rooms in a Busy United States Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30(6):574–7.
Disponível em:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700037097/type/journal_article
57. Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. Curr Microbiol. 2016;73(4):474–82.
Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-016-1081-1>
58. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008;72(2):157–65.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207003909>

59. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. M27-A3 2008.
Disponível em: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf

60. Cobrado L, Ramalho P, Ricardo E, Azevedo M-M, Rodrigues AG. Fast cycle H₂O₂ nebulisation against frequent healthcare-associated microorganisms: efficacy assessment. J Hosp Infect. 2021;184(August):107229.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbuildenv.2020.107229>

61. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Parilova O, Teneberg S, et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Proc Natl Acad Sci. 2018;115(21):5558–63.
Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1800961115>

62. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17):6278.
Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/17/6278>

63. Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard J-Y. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1589–96. Disponível em:
<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dks129>

64. Hou T-Y, Chiang-Ni C, Teng S-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J Food Drug Anal. 2019;27(2):404–14.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>

65. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. Curr Issues Mol Biol. 2017; 23:17–20.
Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28504240>
<http://www.caister.com/cimb/abstracts/v23/17.html>
<https://dx.doi.org/10.21775/cimb.023.017>

66. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. Molecules. 2020;25(12):2888. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2888>

67. Szczuka E, Krzysińska S, Bogucka N, Kaznowski A. Multifactorial mechanisms

- of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(7):1259–65.
Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-1007-3>
68. Castillo-Ramírez S, Mateo-Estrada V, Gonzalez-Rocha G, Opazo-Capurro A. Phylogeographical Analyses and Antibiotic Resistance Genes of *Acinetobacter johnsonii* Highlight Its Clinical Relevance. *Mosphere*: 2020;5(4):1–5.
Disponível em: <https://msphere.asm.org/content/5/4/e00581-20>
 69. Yong YY, Dykes GA, Choo WS. Biofilm formation by *staphylococci* in health-related environments and recent reports on their control using natural compounds. *Crit Rev Microbiol*. 2019;45(2):201–22.
Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1573802>
 70. Erbasan F. Brain abscess caused by *Micrococcus luteus* in a patient with systemic lupus erythematosus: case-based review. *Rheumatol Int*. 2018.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-018-4182-2>
 71. Viegas C, Almeida B, Gomes AQ, Carolino E, Caetano LA. *Aspergillus spp.* prevalence in Primary Health Care Centers: Assessment by a novel multi-approach sampling protocol. *Environ Res*. 2019; 175:133–41.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.015>
 72. Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodriguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. *Clin Dermatol*. 2012;30(6):633–50.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.011>
 73. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC method for yeasts: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. EUCAST. 2020.