



**Diana Patrícia
Pacheco Faneca**

**SENSIBILIDADE DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS
- PROPOSTA TERAPÊUTICA**



**Diana Patrícia
Pacheco Faneca**

SENSIBILIDADE DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS - PROPOSTA TERAPÊUTICA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia (2º Ciclo), realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Mário Jorge V. Pereira, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

**«Só sabemos com exactidão quando
sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida.»**

Johann Goethe

O júri

Presidente

Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira

Prof. Associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira

Investigadora auxiliar de Centro de Estudos do ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Mário Jorge Verde Pereira (orientador)

Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao meu orientador, Mário Jorge V. Pereira, pela simpatia com que me recebeu desde a primeira reunião que realizámos, pelo incentivo, ânimo e apoio científico que sempre me prestou ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À Jacinta Oliveira, pela apresentação de todo o espaço da Universidade, pelo auxílio prestado na pesquisa bibliográfica e pelas palavras de verdadeira amizade que me fizeram acreditar que poderia conseguir atingir os meus objectivos;

Aos meus pais pelo amor e incentivo a progredir em termos académicos e pessoais;

Ao meu Joãozinho pela paciência, carinho e interesse nos meus projectos;

Aos meus amigos que estão sempre presentes quando deles necessito: à Ana, à Inês, à Marta, à Mara, à Carla, ao Alexandre, à Isabel e ao Tozé;

Aos meus colegas de mestrado e de “caminhada”, pela compreensão e apoio;

E por fim à minha enfermeira-chefe, que me ajudou a tomar a decisão de me inscrever no mestrado e que acredita nas minhas capacidades;

O meu Muito Obrigada!...

Palavras-chave

Antibióticos, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, Infecções Urinárias, Tuberculose, Bacteriofagoterapia.

Resumo

Um dos maiores desafios colocados às equipas de saúde é o tratamento de infecções provocadas por agentes bacterianos. A aquisição de resistências aos antibióticos mais utilizados tem registado um aumento significativo constituindo uma preocupação a nível mundial.

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* representam os principais agentes etiológicos das infecções comunitárias mais comuns: as infecções do tracto urinário.

Mycobacterium tuberculosis causa anualmente milhões de mortes por tuberculose em todo o mundo, tendo associada taxas de morbi-mortalidade significativas e constituindo um problema de saúde pública global. Estudos recentes retratam o incremento de resistências, principalmente a nível secundário ou resistências adquiridas. A heterogeneidade de fenótipos da estirpe, parecem constituir um factor de protecção, influenciando na capacidade de a tentar combater.

Este trabalho encontra-se estruturado em duas partes: numa primeira etapa procurou realizar-se uma análise do fenómeno resistência/sensibilidade a alguns antibióticos por parte das estirpes anteriormente referidas aos fármacos testados. Quanto às infecções urinárias, as amostras foram analisadas consoante a resistência a um qualquer antibiótico (testado) e distribuídas pelas estirpes a estudar: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. No que concerne ao estudo dos casos de tuberculose, por *Mycobacterium tuberculosis*, os dados foram separados em contexto ambulatório e hospitalar.

É de interesse referir que os dados obtidos retratam uma região específica do norte de Portugal, não podendo ser generalizados a nível nacional.

Numa segunda fase pretendeu-se descrever a fagoterapia, com recurso a bacteriófagos, como uma proposta terapêutica viável ao uso de antibióticos.

Keywords

Antibiotics, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, Urinary Infections, Tuberculosis, Bacteriophage Therapy.

Abstract

The treatment of infections caused by bacterial agents is one of the biggest problems to healthy teams. The resistance acquired by the microorganisms to the most used antibiotics has been registering a significant raise and represent a general preoccupation.

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* were the most common etiologic agents for communitarian infections like the urinary tract infections.

Mycobacterium tuberculosis is responsible for millions of deaths by tuberculosis, all around the world. At this pathogen we can associate a significant incapacity and mortality number that traduce a global health problem.

Recent studies describe a raise in resistance cases, on a secondary level or even in acquired resistances. The heterogenic fitness of this group is associated to the difficulty to destruct him.

This work was structured in two parts: in a first place we try to analyse the resistance/sensibility occurrence to some antibiotics tested, by bacterial groups referred. The urinary tract infections cases were selected by the presence to one antibiotic resistance tested and distributed by one of these bacterial group in study: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *Pseudomonas aeruginosa*. In tuberculosis cases studied by *Mycobacterium tuberculosis*, we made the separation into ambulatory and hospitable cases.

Is relevant to say that the results represent a specific area from Portugal and they can't be extended into a national level.

In a second place we tried to describe bacteriophage therapy, recurring to Bacteriophages, like a viable therapeutical alternative to antibiotics.

ÍNDICE

Capítulo I

Introdução Geral 01

1. Enquadramento do Tema e Objectivo 03
2. Estrutura da Dissertação 04

Capítulo II

Sensibilidade a agentes quimioterápicos de agentes icteológicos de infecções urinárias 05

Capítulo III

Sensibilidade a agentes quimioterápicos de *Mycobacterium tuberculosis* 23

Capítulo IV

Terapia fágica de infecções bacterianas 39

Capítulo V

Discussão Geral 51

1. Discussão Geral 53
2. Referências Bibliográficas 55

Capítulo I
Introdução Geral

Introdução Geral

1. Enquadramento do Tema e Objectivo

No âmbito do cumprimento do programa do Mestrado de Toxicologia e Ecotoxicologia, integrado nas normas descritas pelo tratado de Bolonha, foi proposto a realização de uma dissertação, cuja temática está relacionada com a antibioterapia, consequências do uso indiscriminado de antibióticos e propostas de alternativas à sua aplicação.

O tratamento de infecções continua a representar um dos grandes desafios colocados à Medicina, em termos globais. Entre elas destacam-se as infecções do tracto urinário, infecções da comunidade, que afectam principalmente mulheres. As estirpes bacterianas mais frequentemente associadas a este tipo de patologia são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus*.

Diversos estudos levados a cabo em diferentes contextos e países, tem vindo a demonstrar que as bactérias têm a capacidade de desenvolver padrões de resistência, escapando à acção antibacteriana dos antibióticos. Deste modo, uma exposição excessiva e prolongada a estes, contribui para o aumento do número de casos de resistência e a uma menor a sensibilidade/eficácia antibacteriana.

A tuberculose é também uma doença infecciosa. Provocada por *Mycobacterium tuberculosis*, tem como principal meio de transmissão as vias respiratórias, sendo por isso de fácil propagação. Causadora de milhões de mortes anualmente, tem registado taxas crescentes de morbimortalidade. Os custos inerentes aos tratamentos de multiresistências e à poli-terapia atingem valores elevados em termos de financiamento e cuidados de saúde. O aparecimento de novas estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, multiresistentes ao primeiro e segundo níveis de tratamento, representam um desafio constante no controlo da doença.

Da emergente constatação de aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos mais utilizados, torna-se imperativo o recurso a novas soluções.

A bacteriofagoterapia traduz um processo que consiste no combate de infecções bacterianas através da lise das bactérias causadoras da doença por um determinado vírus. Como comprovado por vários autores, esta terapia revelou-se eficaz, inócua (em relação aos humanos), específica e económica (em termo de custos).

Deste modo, pretendeu-se realizar uma análise do fenómeno resistência/sensibilidade a alguns antibióticos por parte das estirpes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*, em casos de infecções do tracto urinário e de

tuberculose, em amostras obtidas numa clínica laboratorial de região norte de Portugal e descrever a fagoterapia como uma proposta terapêutica viável ao uso de antibióticos.

2. Estrutura da Dissertação

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos que se expõem pela seguinte ordem:

Capítulo I, constituído por uma introdução geral onde se descreve o enquadramento do tema, os principais objectivos e uma síntese da estrutura da dissertação.

O Capítulo II, designado por “*Sensibilidade a agentes quimioterápicos de agentes ictiológicos de infecções urinárias*” descreve um estudo epidemiológico realizado em colaboração com uma clínica laboratorial do Porto, com o intuito de investigar a ocorrência de resistências por parte de estirpes bacterianas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* a alguns fármacos administrados em casos de infecções urinárias.

O Capítulo III, designado por “*Sensibilidade a agentes quimioterápicos de Mycobacterium tuberculosis*” descreve também um estudo epidemiológico realizado em colaboração com uma clínica laboratorial do Porto e um Hospital da região norte do país. Neste trabalho pretendeu-se investigar a ocorrência de resistências por parte da estirpe bacteriana *Mycobacterium tuberculosis* a alguns fármacos mais administrados em casos de tuberculose pulmonar. Nesta situação foi também relevante a distinção de dados entre os contextos hospitalar e ambulatório.

O Capítulo IV, designado por “Terapia fágica de infecções bacterianas” descreve a história do aparecimento/descoberta dos bacteriófagos, as principais vantagens da sua aplicação como terapia alternativa à administração de quimioterápicos, a forma de metabolização por parte dos organismos em que são aplicados e o recurso enzibióticos.

O capítulo V é constituído pela discussão geral do trabalho final. São descritas algumas informações obtidas ao longo da pesquisa e é proposta uma alternativa, não propriamente recente mas inovadora, ao recurso da antibioterapia no que concerne ao tratamento de infecções.

Capítulo II
Sensibilidade a agentes quimioterápicos de
agentes ictiológicos de infecções urinárias

Sensibilidade a agentes quimioterápicos de agentes ictiológicos de infecções urinárias

Diana Pacheco Faneca ^a Ingride J. Ferreira ^a Mário Jorge Pereira ^{b, c}

^a Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^b CESAM – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^c Autor de correspondência: mverde@ua.pt; Telefone: + 351 234 370 772; fax. +351 234 372 587.

Resumo:

Introdução: Um dos maiores desafios colocados às equipas de saúde é o tratamento de infecções do tracto urinário. Estas constituem importantes infecções da comunidade, afectando, na maior parte dos casos, mulheres de todas as idades. A aquisição de resistências aos antibióticos mais utilizados constitui uma preocupação mundial.

Com este estudo pretendeu-se uma análise do fenómeno resistência/sensibilidade a alguns antibióticos por parte das estirpes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Material e Métodos: O diagnóstico laboratorial permite a caracterização de microrganismos implicados de modo directo e indirecto na etiologia de doenças infecciosas.

No âmbito deste estudo, foi abordada a informação técnica relativa às infecções urinárias, onde os produtos analisados, derivaram exclusivamente de urinas obtidas de vários postos de colheita numa clínica laboratorial da zona do Porto. As amostras foram analisadas pela técnica de coloração de Gram no exame directo e pelo método CPS3 no exame laboratorial. O antibiograma foi realizado diante a utilização do Vitek-Compact® (Biomérieux).

Resultados: Num período de 6 meses foram analisados 836 casos de resistência a antibióticos.

A maioria dos isolados evidenciou uma prevalência de casos nas mulheres (para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), não havendo uma diferença entre sexos, para as infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

Registou-se um padrão de resistência total à ticarcilina por parte da *Klebsiella pneumoniae*. Para a *Escherichia coli* constatou-se uma resistência média-alta à ampicilina, tendo-se registando valores reduzidos no que concerne à nitrofurantoína. Tanto as quinolonas, como a ciprofloxacina e a pefloxacina, demonstraram ter eficácia no combate à *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusão: O estudo confirmou o predomínio da *Escherichia coli* como causadora deste tipo de infecções. Confirmou-se o emergir do número de resistências aos antibióticos de primeira linha como consequência do seu uso indiscriminado.

As características anatómicas dos sexos, o factor etário e a susceptibilidade imunitária são factores de risco para o desenvolvimento deste tipo de infecções.

Esta análise tem importância científica na medida em que dá uma imagem das características da população infectada desta região e alerta para o fenómeno de resistência aos antibióticos.

Palavras-chave: Infecções urinárias, sensibilidade a agentes quimioterápicos, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

1. Introdução

As infecções urinárias constituem uma patologia infecciosa muito frequente e recorrente, constituindo uma preocupação de nível global (De Francesco *et al* 2007, Governado *et al* 2007, Mohammed *et al* 2007, Schooff & Hill 2007, Tankhiwale *et al* 2004, Truls *et al* 2006).

Factores anatómicos, físicos e comportamentais (Mohammed *et al* 2007), convergem para um acréscimo no número de casos em mulheres, quando se compara com o número de homens afectados por este tipo de infecção (Kania *et al* 2000, Kumamoto *et al* 2006, Mohammed *et al* 2007). A idade superior a 65 anos, a existência de cateterismos urinários ou défices imunológicos parecem constituir factores de risco para a doença (Khaikina *et al* 2006, Sotto *et al* 2007).

As bactérias da família das *Enterobacteriaceae* representam o grupo de patogéneos mais comuns nas infecções da comunidade e nosocomiais (De Francesco *et al* 2007, Kania *et al* 2000, Sader *et al* 2003, Tankhiwale *et al* 2004).

As estirpes bacterianas mais frequentemente isoladas e identificadas são a *Escherichia coli* (De Francesco *et al* 2007, Hillier *et al* 2007, Hoshino *et al* 2007, Kania *et al* 2000, Khaikina *et al* 2006, Kumamoto *et al* 2006, Lutter *et al* 2005, Sader *et al* 2003, Schoof & Hill 2007, Sotto *et al* 2007) *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* (De Francesco *et al* 2007, Kania *et al* 2000, Lau *et al* 2004, Sader *et al* 2003). A *Pseudomonas* spp e a *Candida* spp são, na maior parte das vezes, responsáveis pela uro-sépticémia (De Francesco *et al* 2007, Kumamoto *et al* 2006, Truls *et al* 2006).

Vários estudos realizados em diferentes contextos e países, tem demonstrado que as bactérias desenvolvem padrões de resistência para escapar à acção anti-bacteriana dos antibióticos (De Francesco *et al* 2007, Kania *et al* 2000, Lutter *et al* 2005, Mohammed *et al* 2007, Sader *et al* 2003, Schooff & Hill 2007, Truls *et al* 2006).

Quando o aumento de resistência a um determinado antibiótico se verifica num período de tempo relativamente pequeno, as conclusões tornam-se significativas e preocupantes (De Francesco *et al* 2007, Kania *et al* 2000).

Uma exposição excessiva e prolongada aos antibióticos contribui para o aumento do número de casos de resistência e uma menor a sensibilidade/eficácia anti-bacteriana (De Francesco *et al* 2007, Kania *et al* 2000, Lau *et al* 2004, Liu & Mulholland 2005, Mohammed *et al* 2007, Sotto *et al* 2007, Truls *et al* 2006, Wagenlehner *et al* 2007). A associação entre um aumento da dose de antibiótico e uma diminuição na duração do tratamento, pode contribuir para a minimizar o número de resistências (Hillier *et al* 2007).

Este problema exige a actuação de diferentes equipas e uma responsabilização partilhada. Neste contexto pretendeu-se estudar o fenómeno de resistência/sensibilidade, por parte de estirpes bacterianas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, aos antibióticos mais utilizados aquando infecções urinárias, numa determinada região do norte de Portugal.

2. Material e Métodos

2.1 Estratégias e parâmetros utilizados

Colheita, transporte e análise laboratorial

O estudo foi realizado com dados obtidos de vários posto de colheita de uma clínica laboratorial da região norte de Portugal, durante o período entre Outubro de 2004 e Março de 2005.

Foram colhidas amostras de urina (n=838) de utentes com suspeitas de infecções urinárias mediante o método de colheita de micção do jacto médio, por punção do catéter urinário, por punção supra-púbica, por drenagem de nefrostomia/urostomia e por sacos colectores. A urina é um líquido biológico estéril. Erros de interpretação de uruculturas poderão ocorrer devido à colonização da uretra por outros agentes bacterianos (Fonseca *et al* 2004).

Após a colheita, as amostras foram transportadas o mais rapidamente possível ao laboratório, para a realização dos exames directo (exame do esfregaço de urina corado pelo Gram e exame de urina a fresco do sedimento urinário) e cultural (gelose sangue e MacConkey) (Fonseca *et al* 2004).

Durante a realização do exame directo com recurso à técnica de Gram, foi permitido observar o número de microrganismos por campo, com objectiva de imersão (100X) e proceder à contagem do número de colónias ($\geq 1\ 000\ 000$ U.F.C./ml) (Fonseca *et al* 2004).

Recorreu-se ao meio de cultura CPS3 afim de proceder à contagem microbiana, identificação dos grupos bacterianos e actividade enzimática correspondente. Este é um meio de isolamento e de identificação destinado às colheitas/colectas urinárias, que permitiu a contagem microbiana da colheita através de um método de sementeira padronizado e a identificação dos grupos. Esta gelose, constituída por uma base nutritiva que associa duas peptonas e dois substratos cromogénicos, permitiram revelar a actividade enzimática correspondente. A revelação do indol e do TSA foi favorecida pela incorporação de triptofano na gelose. A identificação directa das bactérias mais frequentemente isoladas nas infecções urinárias baseou-se no princípio seguinte: perante *Escherichia coli* com coloração espontânea rosa a bordeaux, existem colónias produtoras de β -glucuronidase e com coloração azul revelada pelo reagente indol existem colónias com triptofanase; perante *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, a coloração espontânea azul-esverdeada das estirpes exprimem uma β -glucosidase. Para a confirmação de cada estirpe isolada e execução do antibiograma, foram realizados no Vitek-Compact® (Biomérieux), com cartas específicas para os microrganismos, através de métodos colorimétricos (Fonseca *et al* 2004).

Na realização dos antibiogramas para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram testados os seguintes fármacos e associações: amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina, cefixime, ceftriaxone, cefalotina, ciprofloxacina, fosfomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, netilmicina, nitrofurantoína, norfloxacina, ticarcilina, tobramicina e co-trimoxazol. Para *Pseudomonas aeruginosa* testaram-se os seguintes associações e fármacos: ticarcilina+ácido clavulânico,

piperacilina+tazobactam, piperacilina, pefloxacina, gentamicina, co-trimoxazol, ciprofloxacina, ceftazidime, cefradina, cefepime, astreonamo e ampicacina.

2.2 Análise dos Dados

Os dados encontram-se apresentados em figuras e tabelas, estando distribuídos segundo ocorrências, por grupos etários e frequência de casos de resistências e sensibilidade aos fármacos e associações testadas.

3. Resultados

No espaço temporal decorrido entre Outubro de 2004 e Março de 2005, foram colhidas amostras de urina (n=838) de sujeitos com suspeita de infecção urinária. Foram contabilizadas as situações com uma ou mais resistências pelas estirpes bacterianas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Escherichia coli

Foram analisadas 726 amostras para esta estirpe. Verificou-se uma prevalência de 82,92% de casos no sexo feminino em relação aos 17,08% no sexo masculino.

O grupo etário que abrange idades superiores aos 60 anos apresentou o maior número de casos (n=328) de resistência tendo compilado 45,18% das amostras, seguindo-se o grupo dos 30-50 anos, com 140 casos (19,28%). Uma menor prevalência foi registada no grupo etário mais baixo (0-10 anos) com 7,30% dos casos (tabela 1 e figura 1).

Tabela 1: Distribuição por grupo etário do número de casos e respectivas percentagens, pela população afectada com infecções do tracto urinário.

Estirpe bacteriana	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	n	%	n	%	n	%
Grupo etário						
0 – 10	53	7,30	4	4,82	4	13,79
10 – 20	19	2,62	0	0,00	0	0,00
20 – 30	77	10,61	7	8,43	1	3,45
30 – 50	140	19,28	18	21,69	2	6,90
50 – 60	109	15,01	6	7,23	3	10,34
≥ 60	328	45,18	48	57,83	19	65,52
Total	726	100,00	83	100,00	29	100,00

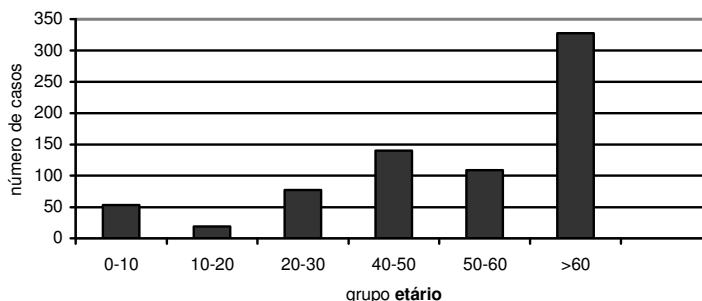


Figura 1: Distribuição etária da população com infecções do tracto urinário, em casos de resistência a pelo menos um antibiótico, para *Escherichia coli*.

Da análise de resistência/sensibilidade aos antibióticos para a *Escherichia coli* salienta-se que a tobramicina e gentamicina (aminoglicosídeos) apresentaram uma resistência de 0,27% e 3,99% respectivamente, quando comparadas com a resistência à ampicilina (uma das penicilinas mais usadas para tratar este tipo de infecções) que apresentou valores na ordem dos 77,55%.

Da análise entre duas quinilonas, é de salientar uma maior eficácia da ciprofloxacina (18,87%) em relação à norfloxacina (29,89%).

Quanto às cefalosporinas, as de primeira geração, tais como a cefalotina tiveram um elevado número de casos de resistência (74,93%), enquanto que as de 3ª geração como a cefixime (12,67%) e a ceftriaxone (5,92%) se mostraram eficazes.

A nitrofurantoína, um dos primeiros antimicrobianos a serem utilizados em infecções urinárias, apresentou valores de resistência de 3,99% (figura 2 e tabela 2).

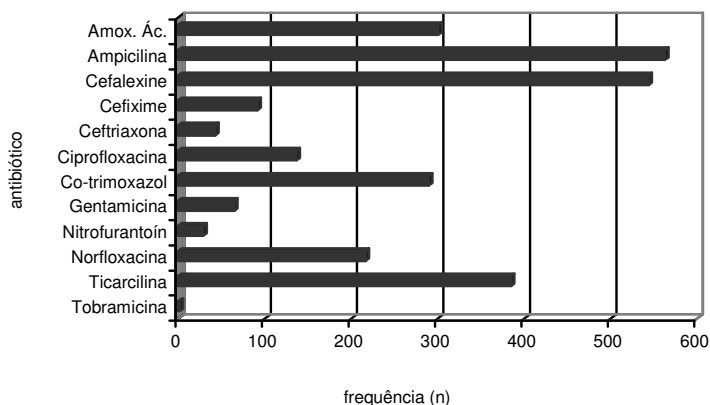


Figura 2: Distribuição dos dados relativos à análise de resistência/sensibilidade aos fármacos e associações testadas para *Escherichia coli*.

Tabela 2: Distribuição da resistência aos fármacos e associações, testada na população afectada com infecções do tracto urinário.

<i>Escherichia coli</i>		
Antibiótico	n	%
<i>Tobramicina</i>	2	0,27
<i>Ticarclina</i>	385	53,03
<i>Norfloxacina</i>	217	29,89
<i>Nitrofurantoína</i>	29	3,99
<i>Gentamicina</i>	65	8,95
<i>Co-trimoxazol</i>	290	39,94
<i>Ciprofloxacina</i>	137	18,87
<i>Ceftriaxona</i>	43	5,92
<i>Cefixime</i>	92	12,67
<i>Cefalotina</i>	544	74,93
<i>Ampicilina</i>	563	77,55
<i>Amoxicilina+Ac. Clavulanico</i>	301	41,46
Total	726	

Klebsiella pneumoniae

Para esta estirpe bacteriana foram analisadas 83 amostras. Verificou-se também uma prevalência de casos no sexo feminino (86,75%) em relação ao sexo masculino (13,25%).

O grupo etário onde se registaram maior número de casos de resistências foi o que abrange idades superiores aos 60 anos (57,83%), seguindo-se o grupo dos 30-50 anos, com 21,69% dos casos. O grupo etário dos 10-20 anos não apresentou nenhum caso de infecção (0,00%) (tabela 1 e figura 3).

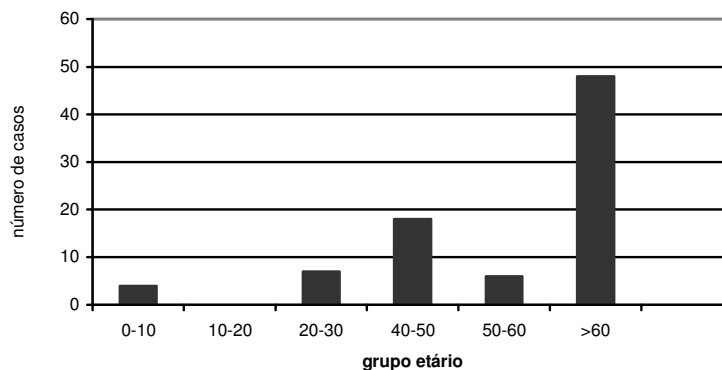


Figura 3: Distribuição etária da população com infecções do tracto urinário, em casos de resistência a pelo menos um antibiótico para *Klebsiella pneumoniae*.

A avaliação de resistência/sensibilidade aos antibióticos para *Klebsiella pneumoniae* revelou que relativamente às quinolonas, a ciprofloxacina foi mais eficaz (12,05%) que a norfloxacina

(81,93%). No que concerne às cefalosporinas, as de primeira geração como a cefalotina, apresentou uma resistência em 61,45% dos casos, enquanto que as de terceira geração como a cefixime e o ceftriaxone se mostraram mais eficazes (2,41% e 13,25%).

A nitrofurantoína representa 20,48% dos valores de resistência. A gentamicina (aminoglicosídeo muito sensível às características do meio) apresentou também uma resistência reduzida (7,23%). A ticarcilina (penicilina) demonstrou ser um antibiótico sem eficácia em 100,00% dos casos, para combater *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, observou-se que quando a uma penicilina (amoxicilina) se associa um inibidor das beta-lactamases, o número de resistências diminui (18,07%) (figura 4 e tabela 3).

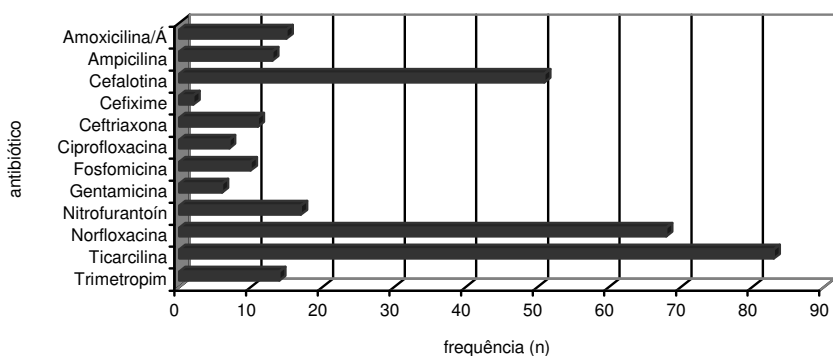


Figura 4: Distribuição dos dados relativos à análise de resistência/sensibilidade aos fármacos e associações testadas para *Klebsiella pneumoniae*.

Tabela 3: Distribuição da resistência aos fármacos e associações, testada na população afectada com infecções do tracto urinário.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Antibiótico	n	%
<i>Trimetoprim</i>	14	16,87
<i>Ticarcilina</i>	83	100,00
<i>Norfloxacina</i>	68	81,93
<i>Nitrofurantoína</i>	17	20,48
<i>Gentamicina</i>	6	7,23
<i>Fosfomicina</i>	10	12,05
<i>Ciprofloxacina</i>	7	8,43
<i>Ceftriaxone</i>	11	13,25
<i>Cefixime</i>	2	2,41
<i>Cefalotina</i>	51	61,45
<i>Ampicilina</i>	13	15,66
<i>Amoxicilina+Ac. Clavulânico</i>	15	18,07
Total	83	

Pseudomonas aeruginosa

Na análise das amostras referentes a *Pseudomonas aeruginosa* não se verificou uma relação entre a frequência de casos com resistência e o sexo dos indivíduos (44,83% do sexo feminino e 55,17% do sexo masculino). Registou-se uma maior prevalência no grupo com idades superiores aos 60 anos (65,52%). No grupo dos 10-20 anos não se contabilizou nenhum caso (0,00%), sendo o grupo das idades compreendidas entre os 0-10 anos (13,79%) o segundo mais afectado (tabela 1 e figura 5).

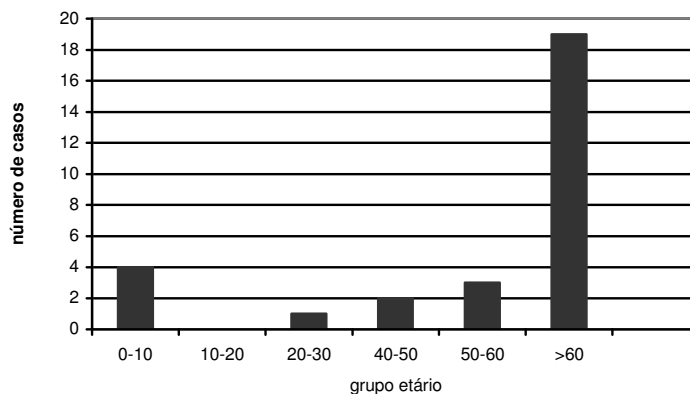


Figura 5: Distribuição etária da população com infecções do tracto urinário, em casos de resistência a pelo menos um antibiótico para *Pseudomonas aeruginosa*.

O estudo da resistência/sensibilidade aos antibióticos para *Pseudomonas aeruginosa* salientou que o co-trimoxazol é um agente antimicrobiano naturalmente resistente (100,00%) no combate a esta estirpe bacteriana.

As quinolonas (ciprofloxacina e pefloxacina) são ineficazes em 34,48% e 13,79% respectivamente. A piperacilina (penicilina) apresenta alguma resistência (41,37%) quando isolada. Verificou-se que quando se associa um inibidor das beta-lactamases, atinge uma eficácia de 6,89%.

Verificou-se uma resistência de 10,34% para a gentamicina e de 6,89% para a amicacina, quando nos reportamos aos aminoglicosídeos.

Quanto às cefalosporinas testadas, a cefradina e ceftazidime, mostram-se também ineficazes para 34,48% dos casos.

Em relação ao astreonamo, houve necessidade de aplicar concentrações elevadas de produto afim de se obter alguma eficácia (41,38% de resistência). A *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se pouco sensível a este antibiótico (tabela 4 e figura 6).

Tabela 4: Distribuição da resistência aos fármacos e associações, testada na população afectada com infecções do tracto urinário.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Antibiótico	n	%
Ticarcilina + Ác. Clavulanico	2	6,89
Piperacilina + Tazobactam	2	6,89
Piperacilina	12	41,37
Pefloxacina	4	13,79
Gentamicina	3	10,34
Co-trimoxazol	29	100,00
Ciprofloxacina	10	34,48
Ceftazidime	10	34,48
Cefradina	10	34,48
Cefepime	5	5,17
Astreonamo	12	41,38
Amicacina	2	6,89
Total	29	

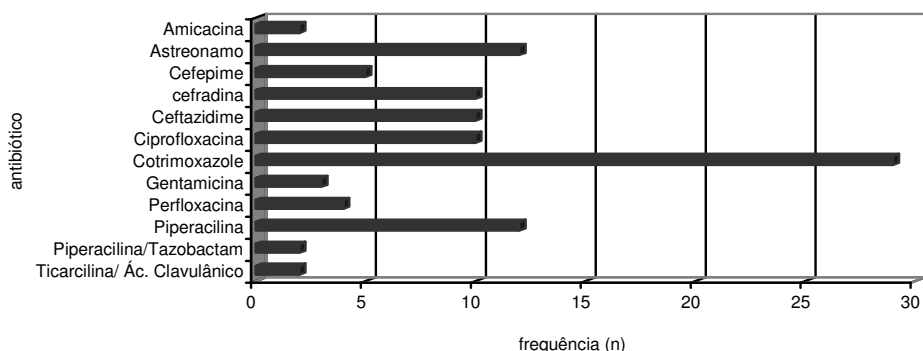


Figura 6: Distribuição dos dados relativos à análise de resistência/sensibilidade aos fármacos e associações testadas para *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Discussão

Este estudo demonstrou a distribuição dos fenómenos de resistência/sensibilidade de algumas estirpes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) a alguns antibióticos testados. Tal como em literatura descrita (De Francesco *et al* 2007, Kumamoto *et al* 2006, Lau *et al* 2004, Sader *et al* 2003, Tankhiwale *et al* 2004, Truls *et al* 2006), estas constituem algumas das estirpes bacterianas mais comumente responsáveis pelas infecções urinárias. Dos

resultados obtidos verificou-se que o microrganismo identificado na maior parte dos casos foi *Escherichia coli*.

No que se refere à distribuição por sexos, a prevalência de casos é atribuída ao sexo feminino em detrimento do masculino, tanto para *Escherichia coli* como para *Klebsiella pneumoniae*. No caso da *Pseudomonas aeruginosa*, os dados analisados não permitiram inferir uma diferença entre ambos.

Uma análise relativamente ao grupo etário permitiu constatar que os sujeitos com idades superiores aos 60 anos, foram os mais afectados na colonização por qualquer dos três tipos de bactérias. O grupo etário dos 0-10 anos foi o que registou menor número de casos tanto para *Escherichia coli* como para *Klebsiella pneumoniae*. Quanto à *Pseudomonas aeruginosa*, o grupo menos vulnerável foi o dos 10-20 anos.

Da análise de resistência/sensibilidade aos antibióticos, foi permitido comprovar que as quinolonas são antibióticos eficazes em todas as estirpes bacterianas estudadas, sendo de salientar uma maior eficácia da ciprofloxacina em relação à norfloxacina, quando nos reportamos à *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae*. Distinguindo cefalosporinas de primeira e terceira geração, verificou-se que as primeiras apresentaram valores de resistência num número considerável de casos, relativamente às de terceira geração. Destes resultados pôde constatar-se que houve um aumento do número de resistências aos primeiros antibióticos, sendo que estes são também os mais administrados (Kania *et al* 2000, Kumamoto *et al* 2006, Liu & Mulholland 2005, Tankhiwale *et al* 2004). O grupo das cefalosporinas de terceira geração constituiu um grupo de antibióticos eficaz em todos os grupos de microrganismos analisados.

Estudos realizados nos USA e Rússia recomendam a nitrofurantoína quando a resistência a outros anti-bacterianos é significativa. Mesmo perante a rápida capacidade de alteração da genética bacteriana, mostrou-se altamente eficaz nos microrganismos responsáveis pelas infecções urinárias (Liu & Mulholland 2005) tendo uma eficácia significativa no tratamento destas infecções (Khaikina *et al* 2007). Neste estudo, mediante a aplicação de nitrofurantoína, verificou-se também uma eficácia elevada, tal como verificado por aqueles autores.

No que concerne aos dados obtidos para a *Escherichia coli*, obteve-se uma resistência reduzida à gentamicina (aminoglicosídeo) em comparação com a resistência à ampicilina. Durante a compilação dos dados foi também possível observar um padrão de resistência simultaneamente à ampicilina, ticarcilina e nitrofurantoína, no que concerne ao tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae*. A ampicilina (penicilina) apresentou um número elevado de resistências, bem como a ticarcilina. As penicilinas, tal como a nitrofurantoína e cefalosporinas representam os grupos de antibióticos mais administrados (De Francesco *et al* 2007).

Pseudomonas aeruginosa é naturalmente resistente ao co-trimoxazol, registando-se resistência na totalidade dos casos. O tratamento preferencial para o combate desta estirpe bacteriana será uma penicilina de amplo espectro (ticarcilina ou piperacilina), combinada com um aminoglicosídeo (gentamicina ou ampicacina). Verificou-se uma resistência muito reduzida relativamente aos

aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina). O astreonamo, também testado, mostrou-se pouco eficaz.

Surge pois a necessidade de uma administração mais criteriosa dos antibióticos a administrar, tendo sempre como base os resultados obtidos em antibiogramas.

5. Conclusões

Este estudo pretendeu analisar os fenómenos de resistência/sensibilidade da *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* a alguns antibióticos, em infecções do tracto urinário causadas por estas estirpes.

Os resultados coincidem com os resultados descritos por outros autores, pelo que a *Escherichia coli* é a estirpe mais comum nas infecções do tracto urinário, nesta região do norte do país, apresentando tal como *Klebsiella pneumoniae*, valores elevados de resistência à ampicilina.

Verificou-se que as quinolonas atingem uma eficácia elevada, não só, mas principalmente, no tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

Verificou-se que a escolha dos antibióticos para combater uma determinada infecção requer uma aplicação regrada e criteriosa. O uso indiscriminado de antibióticos na terapêutica das doenças infecciosas, na agricultura e na pecuária favorece o fenómeno de resistências. As bactérias desenvolveram um comportamento de autênticos “mestres” na área da sobrevivência.

Esta análise, tem importância no sentido em que dá uma imagem das características da população infectada, especificamente da região em estudo e alerta para o aparecimento de um grande número de resistências aos antibióticos mais administrados.

Os estudos de natureza epidemiológica assumem, na etiologia da infecção, uma importância clínica relevante. A prescrição do antibiótico deve ser apoiada de preferência no diagnóstico laboratorial microbiológico, em que é conhecido o agente etiológico e o comportamento *in vitro* deste em relação à infecção.

6. Referências bibliográficas

De Francesco M.A., Ravizzola G., Peroni L., Negrini R., Manca N.: **Urinary tract infection in Brescia, Italy - etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens.** *Med Sci Monit* 2007, **13** (6): 136-144.

Fonseca A., Sebastião C., Martins F., Ribeiro M., Calheiros I., Lito L., Abcassis M., Pinto M., Spencer M., Pinheiro M., Costa M., Barros R., Bento R.: **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.** Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI) 2004: 27-45.

Gobernado M, Valdés L, Alós J. I., Garcia-Rey C., Dal-Ré R., García L.: **Quinolone resistance in female outpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: age-related differences.** *Rev Esp Quimioter* 2007, **20** (2): 206-210.

Hillier S., Roberts Z., Dunstan F., Butler C., Howard A., Palmer S.: **Prior antibiotics and risk of antibiotic-resistant community-acquired urinary tract infection: a case-control study.** *J. Antimicrob Chemother* 2007, **60** (1): 92-99.

Hoshino T., Ishiwada N., Abe K., Sawada K., Kohno Y.: **Clinical and bacterial analysis of pediatric urinary tract infection.** *Kansenshogaku Zasshi* 2007, **81** (1): 6-11.

Kania I., Gospodarek E., Ulatowska B.: **Analysis of the bacterial strains isolated from urine samples of hospitalized and ambulatory patients.** *Med Sci Monit* 2000, **6** (6): 1122-1127.

Khaikina E. V., Reshed'ko G. K., Krechikova O. I.: **Characteristic features of etiology and antibiotic susceptibility of urinary tract infection pathogens in patients with diabetes mellitus.** *Antibiotic Khimioter* 2006, **51** (3-4): 13-18.

Kumamoto Y., Tsukamoto T., Matsukawa M., Kunishima Y., Hirose T., Shigeta S., Yamaguti O., Ishibashi K., Suzutani t., Yoshida H., Imafuku Y, Murai M., Watanabe K., Kobayashi Y., Uchida H., Matsuda S., Sato S., Fujime M., Fujita K., Igari J., Oguri T., Yamaguchi K., Furuya N., Deguchi T., Ishihara S., Ooe H., Oka T., Kitamura M., Fukuhara Y., Kamidono S., Arakawa S., Humon H., Monden K., Matsumoto T., Murati T., Naito S., Egashira T., Konish T., Kohno S., Hirakata Y., Kondo A., Matsuda J., Nakano M.: **Comparative studies on activities of antimicrobial agents against causative organisms isolated from patients with urinary tract infections (2004) II.** *Jpn J Antibiot* 2006, **59** (3): 201-213.

Lau S. M., Peng M. Y., Chang F. Y.: **Resistance rates to commonly used antimicrobials among pathogens of both bacteremic and non-bacteremic community-acquired urinary tract infection.** *J Microbiol Immunol Infect* 2004, **37** (3): 185-191.

Liu H., Mulholland S. G.: **Appropriate antibiotic treatment of genitourinary infections in hospitalized patients.** *Am J Med* 2005, **118** (7A): 14-20.

Lutter S. A., Currie M. L., Mitz L. B., Greenbaum L. A.: **Antibiotic resistance patterns in children hospitalized for urinary tract infections.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005, **159** (10): 924-928.

Mohammed A., Mohammed S., Asad U. K.: **Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007, **10** (1186/1476 – 0711): 6-4.

Sader H. S., Gales A. C., Pfaller M. A., Mendes R. E., Zoccoli C. B., Jones A., Braz R. N.: **Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** *J Infect Dis* 2003, **5** (4): 200-214.

Schooff M., Hill K.: **Urinary Tract Infections in Women May Be Difficult to Treat Because of Overuse of Antibiotics in Food Animals.** *Am Fam Physician* 2007, **71** (7):1301-1302.

Sotto A., De Boever C. M., Fabbro-Peray P., Gouby A., Sirot D., Jourdan J.: **Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study.** *J Clin Microbiol* 2007, **39** (2): 438-444.

Tankhiwale S. S., Jalgaonkar S. V., Ahamad S., Hassani U.: **Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates.** *Indian J Med Rev* 2004, **120** (6): 553-556.

Truls E. B. J., Mete Ç., Naber K. G., Stratchounski L., Svendsen M. V., Tenke P.: **Hospital acquired urinary tract infections in urology departments: pathogens, susceptibility and use of antibiotics Data from the PEP and PEAP-studies.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006, **28** (1): 91-107.

Wagenlehner F. M., Niemetz A. H., Weidner W., Naber K. G.: **Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalised patients with urinary tract infections: 1994-2005.** *Int J Antimicrob Agents* 2007, **31** (1): 25-34.

Capítulo III
Sensibilidade a agentes quimioterápicos de
Mycobacterium tuberculosis

Sensibilidade a agentes quimioterápicos de *Mycobacterium tuberculosis*

Diana Pacheco Faneca ^a Ingrid J. Ferreira ^a Mário Jorge Pereira ^{b, c}

^a Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^b CESAM – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^c Autor de correspondência: mverde@ua.pt; Telefone: + 351 234 370 772; fax. +351 234 372 587.

Resumo:

Introdução: *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, causa anualmente milhões de mortes em todo o mundo. À doença associam-se taxas de morbi-mortalidade significativas, constituindo um problema de saúde pública actual. O número de estirpes resistentes aos antibióticos tem registado um aumento significativo.

Em Portugal, após uma fase de declínio, regista-se actualmente um incremento na incidência do número de infectados, destacando o país a nível europeu.

Neste estudo pretende-se realizar uma avaliação da prevalência da doença/susceptibilidade aos tratamentos de primeira linha, entre Janeiro de 2000 e Junho de 2005. Os dados foram obtidos em ambulatório e em meio hospitalar na região norte de Portugal.

Material e Métodos: A suspeita inicial de tuberculose pulmonar baseia-se em anomalias radiográficas num doente sintomático. O diagnóstico inclui um exame físico, teste de Mantoux, raio X pulmonar, um exame histológico e um exame bacteriológico.

No estudo, as amostras de origem pulmonar (líquidos orgânicos ou tecidos) foram colhidas antes da instituição da terapêutica. Anteriormente ao cultivo pelo método N-cetil-L-cisteína hidróxido de sódio, estas foram sujeitas a descontaminação e homogeneização.

Para identificação inicial dos bacilos recorreu-se à coloração Ziehl-Neelson e resistência à descoloração de EBNER.

Para detecção de resistência aos antibióticos, implementou-se a técnica de diagnóstico molecular INNOLIPA-RIF TUBERCULOSE, innogenetics.

Resultados: Foram analisados 60 casos em ambulatório e 45 em contexto hospitalar. Dos dados colhidos em ambulatório verificou-se uma inflexão dos valores em 2004 após um declínio acentuado entre 2000-2003. Constatou-se uma prevalência no grupo dos 15-44 anos e do sexo masculino em relação ao feminino. Da análise de resistência/susceptibilidade aos antibióticos, registou-se elevada susceptibilidade, não se verificando casos de multi ou poliresistências. Não se constaram casos de resistências à piramizida ou ao etambutol, enquanto que para estreptomina os valores foram de 11%.

Na população hospitalar, o grupo dos 15-44 anos foi também o mais afectado. O número de homens ultrapassa o de mulheres. Constataram-se casos de multi e poliresistências. A sensibilidade aos antibióticos registou-se em cerca de 74% dos casos, sendo a estreptomina o antibiótico com maior número de casos de resistência.

Conclusão: O estudo revelou que após um período de declínio do número de infectados com tuberculose (entre 2000 e 2003), começou a surgir um novo aumento em 2004.

A prevalência do sexo masculino, na faixa etária dos 15-44 anos deve-se, provavelmente, a factores sócio – comportamentais. Regista-se um considerável número de resistências (em função do tempo) à estreptomina (anti-bacilar), como resultado provável da sua aplicação neste tipo de infecção.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, sensibilidade a agentes quimioterápicos.

1. Introdução

Mycobacterium tuberculosis é a bactéria responsável pela maioria dos casos de tuberculose. É um pequeno bacilo aeróbio, ácido-álcool resistente que consegue sobreviver em estado latente durante semanas, pelo que constitui uma das principais estirpes patogénicas. A doença, infecto-contagiosa, transmite-se pelas vias respiratórias através de aerossóis (tosse, espirro, fala), sendo como tal, de fácil transmissão. A tuberculose pulmonar constitui um problema de saúde pública globalizado (Wade & Zhang 2004). Causa a morte em todo o mundo a 3 milhões de pessoas por ano (Matteelli *et al* 2007), havendo referência a 9 milhões (Zager & McNerney 2008) e regista na actualidade taxas crescentes de morbi-mortalidade (Cohen *et al* 2002). Constitui uma epidemia global (Vier *et al* 2007) e incontrolável, em que os custos inerentes aos tratamentos de multiresistências (resistência inicial ou adquirida à isoniazida e rifampicina, com ou sem resistência a outras drogas) e à poli-terapia atingem valores elevados em termos de financiamento e cuidados de saúde (Matteelli *et al* 2007). Marcou e continua a marcar até ao presente, a história da humanidade, não dando tréguas às capacidades da medicina, tornou-se uma das patologias mais temidas.

O panorama torna-se grave quando se constata a existência de novas formas de *Mycobacterium tuberculosis*, multiresistentes ao primeiro e até mesmo ao segundo (Zager & McNerney 2008) níveis de tratamento, sendo registados 400 000 a 425 000 novos casos por ano (Matteelli *et al* 2007, Wade & Zhang 2004, Wells *et al* 2007, Yzquierdo *et al* 2006).

O binómio tuberculose-sida apresenta-se como uma das principais preocupações médicas, uma vez que os seropositivos têm um risco superior de contraírem a doença em relação a sujeitos saudáveis devido à menor capacidade imunológica (Shapiro & Perlmutter 2008). Estudos relacionam esta susceptibilidade a uma má absorção dos anti-tuberculostáticos por partes dos seropositivos, principalmente pela aquisição de resistências à rifampicina (Wells *et al* 2007). Nos não seropositivos, a presença de resistências, a comorbilidade e a hipoalbuminémia formam factores de mau prognóstico, no que se refere a casos de multiresistências (Kim *et al* 2007).

A imigração, o consumo de drogas injectáveis e os fenómenos de exclusão social com expressão crescente, são de enorme importância exigindo uma intervenção focal intensiva.

Os casos de alcoolismo e tabagismo constituem também factores de risco pela associação de doenças pulmonares. Verifica-se uma relação significativa entre derrame pleural e resistência às drogas (Aragó *et al* 2006).

O controlo da doença constitui um desafio constante, apesar da existência da diversa terapia e da administração obrigatória da vacina de BCG, (Wade & Zhang 2004) que induz uma memória inumológica contra o bacilo, mensurável a longo prazo, como já foi demonstrado (Weir *et al* 2008).

O investimento em programas de detecção e vigilância é relativamente recente, pelo que se torna imperativo um conhecimento sobre o mecanismo de resistência às drogas com recurso a testes moleculares de susceptibilidade, de detecção rápida e culturas (Matteelli *et al* 2007, Vier *et al* 2007, Wade & Zhang 2004).

Há estudos que retratam o incremento de resistências, principalmente a nível secundário ou resistência adquirida, por parte da isoniazida e da rifampicina, ainda considerados antibióticos de primeira linha (Aragó *et al* 2006, Gunery *et al* 2004, Zager & McNerney 2008).

Num dos vários trabalhos desenvolvidos, procedeu-se a uma simulação experimental com recurso a ratos, que permitiu concluir que o incremento da susceptibilidade a patologias infecciosas como a tuberculose, se deve à perda de anti-génios específicos, interferindo de forma activa no mecanismo de controlo das doenças (Friedman *et al* 2008).

Num estudo sobre a base molecular de resistência à isoniazida, foi demonstrado que esta apresenta um mecanismo complexo e dinâmico em que existe uma provável interacção entre genes e fenótipos da estirpe com a própria droga. Neste trabalho, foram analisados 240 alelos associados à resistência à isoniazida em 608 amostras de susceptíveis e 408 de casos de resistências. A constatação da existência de 12 genes mutantes nos susceptíveis, parece ter levado os investigadores a sugerir que esses alelos não se envolvem nos mecanismos de resistência (Hazbon *et al* 2006).

Numa outra investigação, foi também realizada uma separação dos genes responsáveis pela resistência às drogas. Nesta pesquisa a temática recaiu também na isoniazida, por ser considerada desde 1952 um dos antibióticos com relativa eficácia a baixa toxicidade. A sua actividade antibacteriana ainda não foi bem compreendida e procura-se que em laboratório seja descoberto o mecanismo de resistência adquirida por parte de *Mycobacterium tuberculosis*. Ao que foi verificado, mutações ocorridas no gene Kat G, alteram ou eliminam a catalase-peroxidase da actividade da *Mycobacterium tuberculosis*, bloqueando a acção da droga e induzindo a capacidade de resistência por parte do microrganismo. O facto desta população bacteriana ser bastante heterogénea e possuir fenótipos diversificados, parece constituir um factor de protecção da espécie, influenciando na capacidade de a tentar combater (Cohen *et al* 2002).

Com data de 2006, têm sido descritas investigações em Cuba, sobre uma possível alternativa ao uso de antibióticos, no que concerne ao tratamento da doença. A aplicação de bacteriófagos, ou neste caso específico, *Mycobacteriófagos*, aparece como uma solução relativamente rápida, segura e eficaz na detecção de resistências à *Mycobacterium tuberculosis* e também na inclusão de testes de sensibilidade às drogas (Yzquierdo *et al* 2006).

É necessário desenvolver novos estudos sobre o metabolismo do bacilo e imunologia da sua parede celular, para compreender as interacções aí existentes, numa tentativa de entender a rápida capacidade de desenvolvimento de resistências (Vier *et al* 2007). O aparecimento de novas formas de tratamento torna-se como tal emergente (Matteelli *et al* 2007, Vier *et al* 2007).

Neste sentido, pretendeu-se com este estudo fazer uma análise da evolução da doença ao longo de um determinado período de tempo (Janeiro 2000 a Junho 2005) e avaliar a

susceptibilidade/resistência aos tratamentos de primeira linha em contexto hospitalar e em contexto de ambulatório.

2. Material e Métodos

2.1 Estratégias e parâmetros utilizados

Colheita, transporte e análise laboratorial

A tuberculose é uma doença sistêmica classificada como pulmonar ou extrapulmonar, por atingir apenas os pulmões em mais de 80% dos casos. O diagnóstico deve incluir um exame físico, uma prova de tuberculina, raio X pulmonar e um exame laboratorial histológico/bacteriológico.

Todas as amostras tiveram proveniência pulmonar (primeira expectoração da manhã, após higiene bucal sem anticéptico e após esforço para tosse) ou de líquidos orgânicos (primeira urina da manhã, colhida em condições de assepsia, durante três dias), antes da implementação da terapêutica antibacilar.

As amostras potencialmente contaminantes foram cultivadas pelo método N-cetil-L-cisteína hidróxido de sódio (o mais recomendado actualmente por ser o menos agressivo para as micobactérias), após descontaminação e homogeneização (Fonseca *et al* 2004).

A identificação bacilar foi realizada pela técnica de coloração Ziehl-Neelson (método de Kinyoun modificado) permitindo a confirmação de todas as amostras positivas (Fonseca *et al* 2004).

Após o tratamento das amostras em KOH e centrifugação, estas foram semeadas em meios especiais de ágar de Lowenstein-Jensen, onde permaneceram incubadas a 36-37°C, em atmosfera enriquecida em CO₂ durante 60 dias. O meio foi analisado semanalmente. A identificação do crescimento e desenvolvimento bacteriano foi constatado pela técnica Middlebrook e Cohen, recorrendo-se ainda ao Sistema radiométrico BACTEC/MGIT BACTEC 460 TB (*Becton Dickinson Diagnostic Instruments, USA*), sondas de ADN e também a técnicas de amplificação de ácidos nucleicos. Para detecção de resistência aos antibióticos, foi implementada a técnica de diagnóstico molecular INNOLiPA-Rif.TB, *Innogenetics* (Fonseca *et al* 2004).

Uma vez que estes procedimentos representam perigo de exposição a agentes biológicos patogénicos, foram tomadas medidas de segurança classificadas nos níveis I e II, segundo a classificação da Sociedade Torácica Americana de três níveis.

2.2 Análise dos Dados

Os dados encontram-se apresentados em figuras e tabelas, estando distribuídos segundo ocorrências, por grupos etários, frequência de casos de resistência/sensibilidade aos fármacos testados e separados por contexto ambulatório ou hospitalar.

3. Resultados

No espaço temporal decorrido entre Janeiro de 2000 e Junho de 2005 foram analisados 60 casos de utentes infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, em contexto de regime ambulatorio e 45 casos em contexto hospitalar, no período de Janeiro a Junho de 2005. As colheitas incluíram doentes duma instituição prisional do norte do país.

Os dados foram apresentados de forma a reunir o máximo de informação. Não foi possível uma classificação dos casos como novos ou re-tratamentos por indisponibilidade de informação.

Contexto de ambulatorio

Foi possível observar um declínio acentuado no número de casos, entre 2000 (64,50%) e 2003 (13,20%), notando-se em 2004 (38,10%) uma inflexão dos valores. A percentagem de 33,30% em 2005 correspondeu a dois dos seis casos de tuberculose pesquisados no primeiro semestre de 2005.

Estes resultados poderão contudo indicar um decréscimo no número de casos (figura 1).

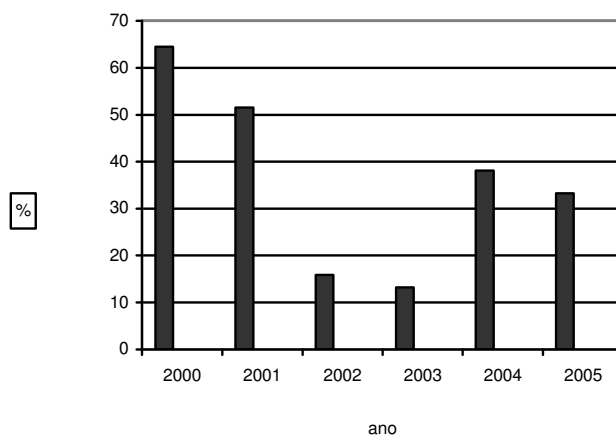


Figura 1: Percentagem do número de infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, no período entre Janeiro de 2000 e Junho de 2005, em contexto de regime ambulatorio.

No que concerne ao sexo, verificou-se uma prevalência de 60,00% no sexo masculino relativamente ao feminino (40,00%) (figura 2).

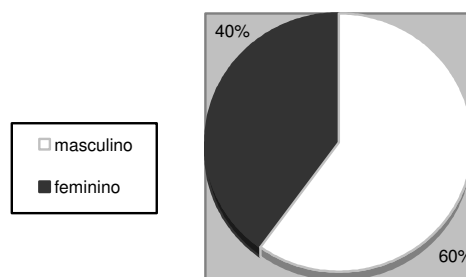


Figura 2: Distribuição por sexos dos casos de infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, em contexto de regime ambulatorio.

O grupo etário dos 15-44 anos foi o que apresentou um maior número de casos (n = 25), seguindo-se o grupo dos 45-64 anos (n = 22). A prevalência mais baixa registou-se no grupo etário mais baixo (0-14 anos) com 3 casos (figura 3).

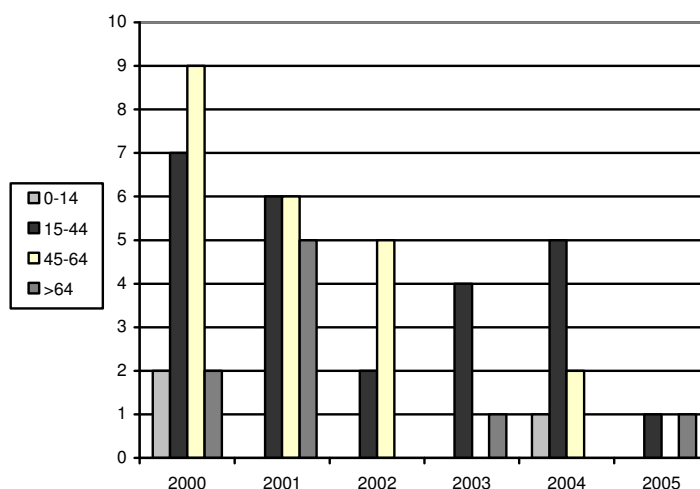


Figura 3: Representação por grupo etário do número de infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, no período entre Janeiro de 2000 e Junho de 2005, em contexto de regime ambulatorio.

Quanto aos resultados obtidos nos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, verificou-se que em 83,30% dos casos existiu sensibilidade à terapêutica administrada. Valores na ordem dos 16,70% representaram a existência de resistência a apenas um antibiótico, não tendo sido observados quaisquer valores no que se refere a multi ou poliresistências.

Da análise de resistências por fármacos, constatou-se a existência de um maior número de casos relativamente à estreptomina (n = 7), tendo-se seguido a isoniazida (n = 2) e por fim a rifampicina

(n = 1). No caso da pirazinamida e do etambutol não se registou a existência de resistências (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição do número de casos e respectivas percentagens nos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, no período entre Janeiro de 2000 e Junho de 2005, em contexto de regime ambulatorio.

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Resistência	n	%
Estreptomicina	7	11,66
Rifampicina	1	1,66
Isoniazida	2	3,33
Pirazinamida	0	0,00
Etambutol	0	0,00
Multiresistências	0	0,00
Poliresistências	0	0,00
Sensibilidade	50	83,30
Total	60	

Da análise longitudinal ao longo do tempo, pôde inferir-se a presença contínua de resistências à estreptomicina, durante o período decorrido entre 2000 e 2004. Em 2005 registaram-se os primeiros casos de resistências à rifampicina. Relativamente à pirazinamida, registou-se um caso de resistência no ano 2002 e um outro em 2003.

O etambutol e a isoniazida não obtiveram quaisquer valores no que se refere à existência de resistências (figura 4).

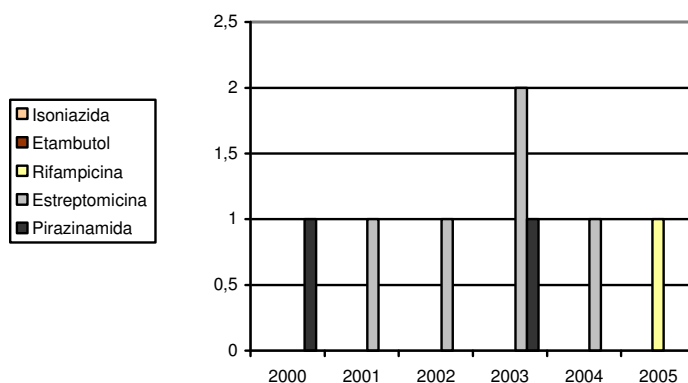


Figura 4: Distribuição dos dados obtidos nos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, em contexto de regime ambulatorio.

Contexto Hospitalar

Os dados apresentados sobre o número de casos de tuberculose em contexto hospitalar, permitiram verificar uma percentagem relativamente mais elevada na faixa etária dos 15 aos 44 anos (68,20%), quando comparada com o grupo dos 45-64 anos (18,20%), não tendo sido registados quaisquer casos de doença (0,00%) no grupo dos 0 aos 14 anos (figura 5).

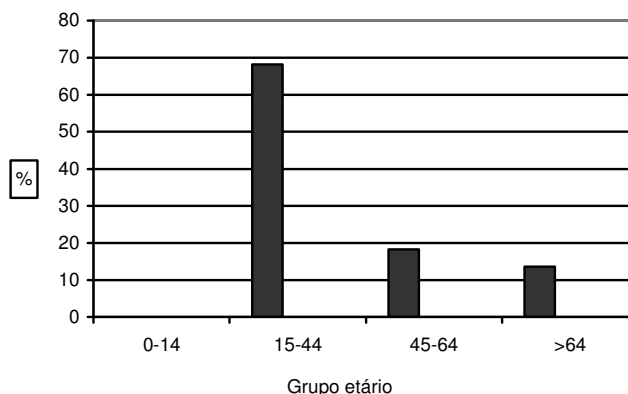


Figura 5: Representação por grupo etário da percentagem de infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, no período entre Janeiro e Junho de 2005, em contexto de regime hospitalar.

No que se refere à distribuição por sexo, registou-se uma maior incidência no sexo masculino (64,00%) relativamente ao feminino (36,00%), valores que coincidem com os anteriormente registados em contexto ambulatório (figura 6).

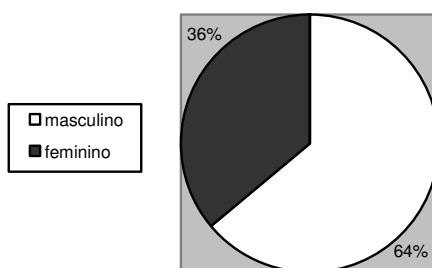


Figura 6: Distribuição por sexos dos casos de infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, em contexto de regime hospitalar.

No contexto das resistências, o cenário hospitalar difere do observado em ambulatório. No primeiro semestre de 2005 foram observados 4,30% de casos de multiresistências, 8,70% de poliresistências e 13,00% de monoresistências. Apesar destes resultados, a sensibilidade aos antibióticos mantém-se bastante elevada (73,90%) (tabela 2 e figura 7).

Tabela 2: Distribuição do número de casos e respectivas percentagens nos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha.

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Resistência	n	%
Estreptomicina	9	20,0
Rifampicina	2	4,40
Isoniazida	4	8,80
Pirazinamida	3	6,60
Etambutol	2	4,40
Multiresistências	2	4,30
Poliresistências	4	8,70
Monoresistências	6	13,0
Sensibilidade	34	73,9
Total	45	

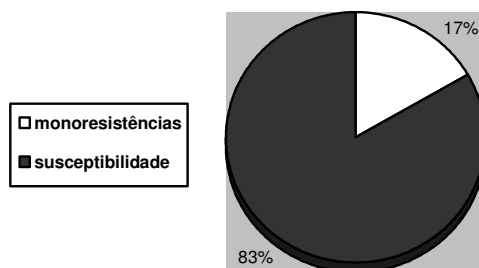


Figura 7: Distribuição dos dados obtidos nos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, em contexto de regime hospitalar.

No que concerne aos casos de resistências aos antibióticos, tal como em ambulatório, verificou-se uma maior incidência de resistências à estreptomicina (n=9), seguindo-se a isoniazida (n=4), a pirazinamida (n=3) e por fim o etambutol (n=2) e a rifampicina (n=2) com o mesmo número de casos (tabela 2).

4. Discussão

O tratamento da tuberculose, bem conduzido, poderá levar a uma grande percentagem de cura, desde que o bacilo se mantenha sensível aos fármacos administrados.

Um esquema terapêutico correcto implica sempre a utilização múltipla de fármacos antibacilares. Os mais utilizados para o tratamento de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* são a

isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina e pirazinamida (Aragó *et al* 2006, Cohen *et al* 2002, Gunery *et al* 2004).

De acordo com os dados observados, verificou-se a existência de um declínio no número de casos de tuberculose entre 2000 e 2003 passando a existir uma inflexão dos valores em 2004. Este facto remete para um novo incremento no número de casos.

O facto da doença ser mais frequente em grupos de adultos jovens (15 aos 44 anos), do sexo masculino, poderá ser resultado de factores sócio-comportamentais: reclusos, sem-abrigo e seropositivos (Cohen *et al* 2002).

No que concerne aos resultados relativos aos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, em contexto ambulatorio, verificou-se existir uma elevada sensibilidade à terapêutica. Apesar dos casos de resistência a apenas um antibiótico, não foram observados quaisquer resultados de multi ou poliresistências.

Da análise aos diferentes fármacos, constatou-se a existência de um maior número de casos de resistências relativamente à estreptomina, à isoniazida e à rifampicina. Tal como descrito em literatura, o actual problema da resistência a antibióticos como a isoniazida e a rifampicina poderá ser uma consequência de administrações incorrectas (Yzquierdo *et al* 2006). Quanto à pirazinamida e ao etambutol, não se registaram casos de resistências.

Ainda em termos de resistências, o cenário hospitalar difere do descrito anteriormente em contexto ambulatorio. No primeiro semestre de 2005 registaram-se alguns casos de multi e poliresistências, sendo o número de monoresistências superior aos anteriormente referidos. Tal como referido por (Zager & McNerney 2008), o cenário geral de tratamento torna-se preocupante quando se constata a existência de novas formas de *Mycobacterium tuberculosis*, multiresistentes ao primeiro e até mesmo ao segundo níveis de tratamento. Tal como em ambulatorio, verificou-se um considerável número de resistências à estreptomina e isoniazida. Existem também casos de resistência à pirazinamida, etambutol e rifampicina, ainda que em menor número.

O facto de surgirem resistências aos antibacilares, pode estar relacionada com o seu modo de acção, mas também com as próprias características da estirpe bacteriana. Esta população bastante heterogénea e com diversos fenótipos tem a capacidade de se proteger, limitando a capacidade de a tentar combater (Cohen *et al* 2002). Torna-se cada vez mais necessário o recurso a medicamentos de segunda linha ou eventualmente a outras formas de tratamento, para combater essas mesmas infecções.

5. Conclusão

Após um declínio no número de caso de tuberculose mais acentuado entre 2000 e 2003, verificou-se a existência de uma inflexão dos valores em 2004.

Os resultados demonstraram a existência de multi e poliresistências aos antibacilares estudados. Em contexto ambulatorio verificou-se um reduzido mas existente número de casos de multiresistências no primeiro semestre de 2005. Em contexto hospitalar, a sensibilidade aos

antibióticos manteve-se elevada, apesar da existência de casos de multiresistências, poliresistências e monoresistência. A estreptomomicina foi o antibiótico com maior número registado de resistências em ambos os contextos, provavelmente pelo seu uso mais generalizado no tratamento deste tipo de infecções.

Um dos problemas mais comuns no que concerne à aquisição de resistências por parte de *Mycobacterium tuberculosis* relaciona-se com a incorrecta toma e abandono precoce da medicação, mas também as características do próprio bacilo, pelo desconhecimento das suas capacidades e metabolismo.

O desenvolvimento de estratégias para conseguir uma adesão à terapêutica por parte dos infectados, supervisionada por profissionais de saúde conscientes das consequências da toma incorrecta destes medicamentos, mas também a implementação de mais testes de susceptibilidade e ainda o desenvolvimento de novas formas de terapia, tornou-se uma prioridade. Este estudo tem interesse no sentido em que retrata a realidade actual de uma determinada região do norte do país no que concerne à aquisição de resistências à antibioterapia por parte da *Mycobacterium tuberculosis*. O estudo demonstra a necessidade de terapias alternativas no que concerne ao tratamento da tuberculose.

7. Referências bibliográficas

Aragó G. M., Belda M. A., Albert C. A., Serra S. B., Amorós Q. I., Prat F. J., Escoms T. R., González C.: **Anti-tuberculosis drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in the area of the Hospital de Sagunto from 1999 to 2004.** *Rev Clin Esp* 2006, **206** (8): 376-381.

Cohen T., Sommers B., Murray M.: **The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*.** *The Lancet Infectious Diseases* 2006, **3** (1): 13–21.

Fonseca A., Sebastião C., Martins F., Ribeiro M., Calheiros I., Lito L., Abcassis M., Pinto M., Spencer M., Pinheiro M., Costa M., Barros R., Bento R.: **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.** Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI) 2004: 37-41.

Friedman A., Turner J., Szomoloy B.: **A model on the influence of age on immunity to infection with *Mycobacterium tuberculosis*.** *Exp Gerontol* 2008, **43** (4): 275-285.

Güneri S., Unsal I., Oztop A., Erkut M., Avkan Oğuz V., Ozgü A., Cakmak R.: **The resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* strains to antituberculosis drugs: evaluation of two years' data in Aegean region, Turkey.** *J Antimicrob Chemother* 2004, **38** (3): 203-212.

Hazbón M. H., Brimacombe M., Bobadilla del Valle M., Cavatore M., Guerrero M. I., Varma-Basil M., Billman-Jacobe H., Lavender C., Fyfe J., García-García L., León C. I., Bose M., Chaves F., Murray M., Eisenach K. D., Sifuentes-Osornio J., Cave M. D., Ponce de León A., Alland D.: **Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50** (8): 2640-2649.

Kim H. R., Hwang S. S., Kim H. J., Lee S. M., Yoo C. G., Kim Y. W., Han S. K., Shim Y. S., Yim J. J.: **Impact of extensive drug resistance on treatment outcomes in non-HIV-infected patients with multidrug-resistant tuberculosis**. *Clin Infect Dis* 2007, **15** (10): 1290-1295.

Matteelli A., Migliori G. B., Cirillo D., Centis R., Girard E., Raviglioni M.: **Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control**. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007, **5** (5): 857-871.

Shapiro H. M., Perlmutter N. G.: **Killer applications: toward affordable rapid cell-based diagnostics for malaria and tuberculosis**. *Cytometry B Clin Cytom* 2008, **74** (1): 152-164.

Vier H., Schaberg T., Gillissen A.: **Emergence extensive drug resistance tuberculosis (XDR)**. *Pneumologie* 2007, **61** (9): 606-609.

Wade M., Zhang M. Y.: **Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. *Fronti Biosci* 2004, **9** (1): 975-994.

Weir R. E., Gorak-Stolinska P., Floyd S., Lalor M. K., Stenson S., Branson K., Blit R., Bem Smith A., Fine P. E., Dockrell H. M.: **Persistence of the immune response induced by BCG vaccination**. *BMC Infect Dis* 2008, **8** (1): 9.

Wells C. D., Cegielski J. P., Nelson L. J., Laserson K. F., Holtz T. H., Finlay A., Castro K. G., Weyer K.: **HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm**. *J Infect Dis* 2007, **15** (1): 86-107.

Yzquierdo S. L., Lemus D., Echemendia M., Montoro E., McNerney R., Martin A., Palomino J. C.: **Evolution of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials* 2006, **5** (4): 11
doi :10.1186/1476-0711-5-11.

Zager E. M., McNerney R.: **Multidrug-resistant tuberculosis**. *BMC Infect Dis* 2008, **8** (1): 10.

Capítulo IV
Terapia fágica de infecções bacterianas

Terapia fágica de infecções bacterianas

Diana Pacheco Faneca ^a Jacinta Oliveira ^b Mário Jorge Pereira ^{b, c}

^a Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^b CESAM – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^c Autor de correspondência: mverde@ua.pt; Telefone: + 351 234 370 772; fax. +351 234 372 587.

Resumo:

A descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, dos antibióticos em geral e o início da sua utilização no combate às doenças infecciosas, constituiu um dos maiores avanços da medicina do séc. XX. Apesar da sua eficácia, cedo se constatou que as bactérias desenvolviam mecanismos para escapar à acção anti-bacteriana dos antibióticos. Com a massificação do uso destes promoveu-se um aumento de estirpes resistentes aos antibióticos, comprovando serem autênticos “mestres” na área da sobrevivência.

Os fagos integram o conjunto de seres mais abundantes e disponíveis no meio ambiente, os vírus. Há ainda muito a descobrir sobre as suas capacidades e eventuais aplicações. Os primeiros estudos a evidenciar a existência dos bacteriófagos (fagos) ocorreram no século XX, com a verificação da existência de actividade antibacteriana por parte destes agentes. Contudo, a utilização da fagoterapia como prática medicinal foi abandonada face ao aparecimento, êxito e generalização do uso de antibióticos, de forma particular após a Segunda Guerra Mundial.

Verifica-se na actualidade um incremento do número de bactérias multiresistentes aos antibióticos mais administrados. Estudos com bacteriófagos/enzibióticos (enzimas líticas) emergem como possíveis alternativas terapêuticas. Esta opção tem-se revelado eficaz, vantajosa e inovadora no que concerne ao controlo e tratamento das infecções bacterianas no Homem, animais e mesmo na biopreservação de alguns alimentos.

Existe em literatura científica uma vasta descrição de vírus fágicos estando a sua classificação taxonómica incluída no *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), consoante a sua morfologia e material genético.

Questões como a forma de metabolização por parte dos organismos receptores dos fagos, a quantidade, via e frequência de inoculações precisas para que evidenciem resultados favoráveis continuam por ser esclarecidas. Evidencia-se também um crescente interesse na obtenção de novas soluções que possam complementar o conhecimento já existente sobre o combate das bactérias causadoras de doenças infecciosas.

O aparecimento da fagoterapia marcou o nascimento da biologia molecular, contribuindo de forma substancial para o conhecimento da actividade celular bacteriana, mais concretamente sobre o processo de replicação do ADN e da sua capacidade de transferir o seu material genético a uma célula hospedeira. Com a marcação radioactiva dos fagos, puderam confirmar-se estudos antecedentes sobre a importância dos ácidos nucleicos na constituição do genoma das células.

Palavras-chave: Vírus, Bacteriófagos, Antibioterapia.

Introdução:

História

A palavra bacteriófagos deriva da união de bactéria com *phagein* do grego “para comer”. Estes são vírus que interferem com o metabolismo bacteriano conduzindo à lise da sua hospedeira (Thiel 2004). Fazem parte do grupo dos organismos mais abundantes na natureza (Ronda *et al* 2003), são consumindo regularmente com os alimentos e constituem colonizadores naturais do intestino humano (Garcia & Lopéz 2002, Sulakvelidze & Morris 2001).

Ernest Hankin (1896) foi o primeiro a observar a existência de uma actividade antibacteriana contra a *Vibrio cholerae*, por certas substâncias que não conseguiu designar (Hankin 1896). Em 1898, estudos realizados sobre *Bacillus subtilis*, por Gamaleya, conduziram a conclusões semelhantes, marcando o nascimento da fagoterapia (Samsygina & Boni 1934).

D’Herelle (1915) foi o primeiro a proferir o nome bacteriófago após descrever a possibilidade de serem vírus a destruir as bactérias. A descoberta oficial por Twort (Inglaterra) e D’Herelle (Instituto Pasteur, Paris), assim como o início da sua utilização como uma terapêutica alternativa aos antibióticos, remonta pois ao século XX (Biswas *et al* 2002, Ronda *et al* 2003).

Contudo, o desconhecimento da biologia dos fagos (Eaton & Bayne-Jones 1934), a generalização da antibioterapia (Garcia & Lopéz 2002) e a falta de testes de controlo e protocolos experimentais rigorosos (Eaton & Bayne-Jones 1934, Garcia & Lopéz 2002), encontram-se entre os principais motivos que convergiram para o seu esquecimento.

Aplicação e vantagens do uso

As dificuldades socio-económicas, o desenvolvimento de experiências terapêuticas com recurso aos fagos (inclusivamente em humanos) foram mantidas por alguns países da antiga União Soviética (Polónia e Geórgia), tendo sido publicados numerosos artigos sobre esta temática (Garcia & Lopéz 2002, Sulakvelidze & Morris 2001). Sucederam-se vários estudos com obtenção de resultados positivos, não só em humanos, mas também em animais e na agricultura (Thiel 2004). No Ocidente, Slopek e seus colaboradores publicaram uma importante série de documentos sobre uma aplicação mais eficaz dos fagos, em comparação com os antibióticos, contra bactérias patogénicas multiresistentes (Slopek *et al* 1987, Sulakvelidze & Morris 2001).

A sua comprovada eficácia, inocuidade (em relação aos humanos), especificidade (não interferindo na população bacteriana comensal dos organismos), adicionando o facto de se apresentarem em quantidades abundantes no ambiente (solo, alimentos, água) e de envolverem baixos custos, constituem as principais vantagens do recurso à fagoterapia (Garcia & Lopéz 2002, Parisien *et al* 2008).

Os bacteriófagos constituem elementos significativos no funcionamento dos ecossistemas aquáticos, interferindo nestes em termos de produção, respiração diversidade genética e até mesmo na abundância de outros microrganismos. Pesquisas desenvolvidas em regiões polares,

vieram comprovar a relação entre os bacteriófagos e os seus hospedeiros, assim como a existência de variações neste tipo de relação, consoante a presença de meios abióticos ou bióticos (Sawstrom *et al* 2008).

Estudos continuam a mostrar a capacidade que os fagos têm na inibição do crescimento bacteriano (Fukunaga *et al* 2000), tornando-se úteis no controlo de determinadas infecções bacterianas supurativas (Slopek *et al* 1987), no tratamento da disenteria (Sulakvelidze & Morris 2001) e colites hemorrágicas (Kudva *et al* 1999), na eliminação de *Enterococcus* nosocomiais (Biswas *et al* 2002), no combate de meningites bacterianas (via nasal), tendo sido postulada a capacidade de poderem atravessar a barreira hematoencefálica (Frenkel & Solomon 2002) e até mesmo na indução de uma resposta anti-tumoral por parte do sistema imunitário, mediante a aplicação de bacteriófagos T4 (Pajtasz-Piasecka *et al* 2007).

Perante o aumento gradual de aparecimento de multi resistências às drogas utilizadas no tratamento de infecções uropatogénicas por *Escherichia coli*, investigadores Japoneses (2008), propondo a fagoterapia como uma alternativa ao uso de antibióticos, administraram fagos T4 e KEP 10 (novos isolados aplicados neste tipo de terapia) na cavidade peritoneal de ratos, tendo verificado um decréscimo na mortalidade dos ratos inoculados com os fagos e a inexistência de efeitos adversos atribuídos à aplicação destes agentes (Nishikawa *et al* 2008). Novas pesquisas mostram a existência de mais dois tipos de colifagos com capacidade de combate à estirpe bacteriana *Escherichia coli*: MSBS e MVSS tendo-se verificado que ao contrário do que acontece com a aplicação de antibióticos, neste caso não ocorre a formação da toxina produzida por *Shigella* (Viscardi *et al* 2008).

Replicação

Os Bacteriófagos podem distinguir-se pela sua capacidade de replicação. Existem dois tipos de ciclos: o lítico e o lisogénico, existindo um pequeno número de vírus com capacidade de executar ambos os ciclos.

O estudo do fago T4 permitiu delinear a sequência do complexo processo de cada ciclo lítico (Sulakvelidze & Morris 2001). Após penetração na parede celular da bactéria e consequente replicação do ADN viral no interior da célula bacteriana, esta é destruída conduzindo à libertação de novos fagos aptos a invadir novas hospedeiras. Este tipo de ciclo é o mais favorável quando se pretende obter uma terapia fágica (Thiel 2004).

Por oposição, nos ciclos lisogénicos o resultado final não é a lise da bactéria mas sim a integração e replicação do ADN viral no ADN bacteriano, podendo o vírus estabelecer-se como plasmídeo. Nesta situação o fago denomina-se temperado. O Vírus permanece adormecido até que as condições do meio se tornem desfavoráveis e os fagos endógenos *profagos* sejam libertados, tornando-se activos. Nesta situação a célula invadida sobrevive e pode replicar-se durante várias gerações, transmitindo a informação genética do vírus em cada processo (Sulakvelidze & Morris 2001). Ao processo de penetração celular está implícito o conceito de especificidade em que apenas determinados receptores são capazes de destruir a parede celular bacteriana (Thiel 2004).

A descoberta e aprofundamento sobre os mecanismos envolvidos nestes processos tem permitido o desenvolvimento da biologia genética em seres microscópicos como os vírus que sendo de um tamanho bastante inferior ao das bactérias, conseguem afectar o seu ciclo vital.

Pesquisas efectuadas com recurso à marcação radioactiva dos fagos, vieram confirmar a importância dos ácidos nucleicos na constituição do genoma celular (Garcia & Lopéz 2002).

Metabolização por parte dos organismos

Nos primórdios da fagoterapia, pensou-se na possibilidade de destruição fágica por parte do ácido gástrico, aquando administrações orais de cocktails fágicos (Ronda *et al* 1981). A sua capacidade de resistência a condições variáveis de pH e temperatura conferem-lhe, no entanto, estabilidade e condições para resistirem ao tracto digestivo (Ronda *et al* 2003). Estudos subsequentes demonstraram que os fagos atingem sempre o sistema hemático, independentemente da via de administração (Ronda *et al* 1981).

Geier e seus colaboradores, propuseram o desenvolvimento de anticorpos, por parte do sistema imunológico, para a eliminação fágica da corrente sanguínea (Geier *et al* 1973). O certo é que ainda não se conseguiu determinar o tempo de permanência desses anticorpos no sangue, nem a via propulsora da sua formação (Garcia & Lopéz 2002). Admitindo-se a necessidade de execução de mais testes toxicológicos, há resultados que sugerem que os fagos são reconhecidos, retidos e eliminados pelo organismo, através do sistema reticulo-endotelial (baço, fígado e pâncreas), onde podem permanecer durante períodos prolongados de tempo (Babalova *et al* 1968, Sulakvelidze & Morris 2001). Uma questão que também ainda não foi solucionada relaciona-se com a quantidade e frequência de administração necessárias, para que os bacteriófagos actuem de forma eficaz contra as bactérias, antes de serem destruídos pelo sistema anteriormente referido (Merryl *et al* 1996).

Devem ser tidos em conta determinados critérios na selecção dos fagos, uma vez que, após terem integrado o genoma da célula hospedeira poderão alterar a sua virulência e o pretendido combate à bactéria (Parisien *et al* 2008).

Na actualidade, os fagos são utilizados na forma purificada, sendo administrados após um tratamento com cloreto de cézio e centrifugação, momento em que ocorre a separação dos restos bacterianos dos lisados crus (Ronda *et al* 2003). Posteriormente, é possível a sua inoculação por via peritoneal ou oral, impregnado os alimentos a consumir com concentrados de fagos (Ronda *et al* 2003).

Enzibióticos

O termo enzibiótico é relativamente recente na história da fagoterapia, resultando da combinação das palavras enzima com antibiótico. Esta denominação traduz um processo que consiste no combate de infecções bacterianas através da lise das bactérias causadoras da doença por um determinado vírus (Veiga-Crespo *et al* 2007).

No que concerne à actividade antibacteriana, foi proposto um mecanismo de penetração do fago na parede celular da bactéria, com uma conseqüente transdução do seu ADN no desta. O fenómeno convergiria na lise bacteriana. Estudos criteriosos, revelaram existir diferenças significativas nos ciclos de replicação dos fagos, sugerindo existir um processo em cascata que envolve fenómenos de estruturação e regulação genética (Sulakvelidze & Morris 2001).

As enzimas fágicas (amidases, glucosaminidases, endopeptidases ou transglucosidases) recebem uma denominação consoante o enlace químico que estabelecem na parede bacteriana, para provocar a lise e conseqüente libertação da descendência fágica. Fischetti sugeriu a designação de enzibióticos (Such *et al* 2002).

Estas enzimas são codificadas pelo genoma dos fagos e o seu uso pretende controlar os patogéneos através da prevenção dos seus “ataques” ou da sua eliminação. Há investigadores que sugerem existir uma maior possibilidade de aparecimento de resistências frente a estas enzimas líticas do que mediante a utilização de concentrados de fagos (Ronda *et al* 2003).

A aplicação enzimática dos bacteriófagos foi testada em 2001 na Universidade Rockefeller com o objectivo de eliminar estreptococcus do grupo A e pneumococcus em ratos. Com uma aplicação de 1000U de enzimas purificadas pôde verificar-se uma purificação do cultivo de 10 000 000 bactérias em 5 segundos (Loeffler *et al* 2001, Nelson *et al* 2001).

Em outras experiências com *Streptococcus pneumoniae*, recorrendo a ratos vivos, constatou-se que alguns segundos depois da aplicação de amidase Pal (enzima clonada do genoma do fago Dp-1) bastaram para destruir os 15 serotipos bacterianos mais comuns, não tendo sido registadas resistências ou alterações das estirpes comensais. Ensaio *in vitro* com *Bacillus anthracis* confirmaram resultados obtidos anteriormente no que concerne ao poder destrutivo dos enzibióticos e à sua capacidade na identificação dos esporos do carbúnculo (Garcia & Lopéz 2002, Ronda *et al* 2003). Estudos preliminares realizados em Madrid (Ronda *et al* 2003) demonstraram uma utilização eficaz das lisozimas codificadas por fagos, para combate de *pneumococcus* da família *Podoviae*, aquando uma aplicação por via peritoneal (Ronda *et al* 1981). Em Cuba, (2006) ficou ainda comprovada a rapidez e eficácia dos *Mycobacteriophages*, no que concerne à detecção de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* viáveis para a realização de testes clínicos e ainda em testes de sensibilidade aos antibióticos, quando se verifica a crescente aquisição de resistência a antibióticos como a rifampicina, considerados de primeira linha no combate à tuberculose pulmonar (Yzquierdo *et al* 2006).

As novas tecnologias tem contribuído de forma fundamental para a compreensão de todo o processo lítico dos fagos, da sua organização estrutural (com imagens tridimensionais) e do mecanismo de reconhecimento da parede celular bacteriana, onde penetram (Hermoso *et al* 2007).

A fagoterapia continua a gerar longas divergências no campo científico. Com o aparecimento de resistências aos antibióticos clássicos, o recurso aos fagos aparece com uma alternativa viável,

uma vez que da sua aplicação oral, rectal, peritoneal, por aerossóis ou tópica não se registaram ainda complicações secundárias graves.

Referências Bibliográficas:

Babalova E. G., Katsitadze K. T., Sakvarelidze L. A., Imnaisvili N. S., Sharashidze T. G., Badashvili V. A., Kiknadze G. P., Meiparini A. N., Gendzekhadze N. D., Machavariani E. V., Gogoberidze K. L., Gozalov E. I., Dekanosidze N. G.: **Preventive value of dried dysentery bacteriophage.** *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1968, **45** (2): 143-145.

Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel AN., Powell B., Carlton R., Merrill C.R.: **Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.** *Infect immune* 2002, **70** (1): 204-210.

Eaton M. D., Bayne-Jones S.: **Bacteriophage therapy. Review of the principle and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections.** *J Am Med Assoc* 1934, **103**: 1769-1776.

Frenkel D., Solomon B.: **Filamentous phage as vector-mediated anti-body delivery to the brain.** *Proc Natl Acad USA* 2002, **99** (8): 5675-5679.

Fukunaga M., Mori K. I., Nakai T., Park S. C., Shimamura I.: **Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control.** *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66** (4): 1416-1422.

García E., López R.: **Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos.** *Rev Esp Quimioterapia* 2002, **15** (4): 306-312.

Geier M. R., Frigg M. E., Merrill C. R.: **Fate of bacteriophage lambda in non-immunized germ-free mice.** *Nature* 1973, **246** (5430): 221-223.

Hankin E. H.: **L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera.** *Ann Inst Pasteur* 1896, **10**: 511.

Hermoso J. A., Garcia J. L., Garcia P.: **Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzymiotics.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10** (5): 461- 472.

Kudva I. T., Jelacic S., Tarr P. I., Youderian P., Hovde C. J.: **Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65** (9): 3767-3773.

Loeffler J. M., Nelson D., Fischetti V. A.: **Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase.** *Science* 2001, **294** (5549): 2170-2172.

Merryl C. R., Biswas B., Carlton R., Jensen N. C., Creed G. J., Zullo S., Adhya S.: **Long-circulation bacteriophage as antibacterial agents.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** (8): 3188-3192.

Nelson D., Loomis L., Fischetti V. A.: **Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A *Streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme.** *Proc Natl Acad Sci* 2001, **98** (7): 4107-4112.

Nishikawa H., Yasuda M., Uchiyama J., Rashel M., Maeda Y., Takemura I., Sugihara S., Ujihara T., Shimizu Y., Shuin T., Matsuzaki S.: **T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of *Escherichia coli* urinary tract infections.** *Arch Virol* 2008, **153** (3): 507-515.

Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Dus D., Weber-Dabrowska B., Zablocka A., Górski A.: **Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC- based vaccine against murine transplantable colon carcinoma.** *Immunol Lett* 2007, **116** (1): 24-32.

Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q.: **Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides.** *J Appl Microbiol* 2008, **104** (1): 1-13.

Rice T. B.: **Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions; report of 300 cases.** *Am J Med Sci* 1930, **179**: 336-345.

Ronda C., Lopéz R., Garcia E.: **Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infection *Streptococcus pneumoniae*.** *J Virol* 1981, **40** (2): 551-559.

Ronda C., Lopéz R., Vasquez M.: **Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura.** *Ver AquaTIC* 2003, **18**: 3-10.

Samsygina G. A., Boni E. G.: **Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice.** *Pediatrics* 1934, (4): 67-70.

Sawstrom C., Lisle J., Anesio A. M., Priscu J. C., Laybourn- Parry J.: **Bacteriophage in polar inland waters.** *Extremophiles* 2008, **12** (2):167-175.

Schuch R., Nelson D., Fischetti V. A.: **A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis***. *Nature* 2002, **418** (6900): 884-889.

Slopek S., Weber D. B., Dabrowski M., Kucharewicz-Kurukwska A.: **Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1982-1986**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987, (35): 569-583.

Sulakvelidze A., Morris J.G. Jr.: **Bacteriophage as therapeutic agents**. *Ann Med* 2001, **33** (8): 507-509.

Thiel K.: **Old Dogma, new tricks 21st Century phage therapy**. *Nature Biotechnology* 2004, **22** (1): 31-36.

Veiga-Crespo P., Ageitos J.M., Poza M., Villa T. G.: **Enzybiotics: a look to the future, recalling the past**. *J Pharm Sci* 2007, **96** (8):1917- 1924.

Viscardi M., Perugini A. G., Auriemma C., Capuano F., Morabito S., Kim K. P., Loessner M. J., Iovane G.: **Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC)**. *Int J Antimicrob Agents* 2008, **31** (2): 152-157.

Yzquierdo S. L., Lemus D., Echemendia M., Montoro E., McNerney R., Martin A., Palomino J. C.: **Evolution of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials* 2006, (5): 11 doi: 10.1186/1476-0711-5-11.

Capítulo V
Discussão Geral

Discussão Geral

1. Discussão Geral

Neste estudo apresentou-se informação sobre as características da população infectada numa determinada região de Portugal e alertou-se para o fenómeno da aquisição de resistências aos antibióticos, enfatizando a necessidade de selecção criteriosa destes, aquando a instituição de regimes terapêuticos.

Numa primeira abordagem remeteu-se ao estudo de casos de infecções urinárias. Pretendeu-se demonstrar a distribuição dos fenómenos de resistência/sensibilidade de algumas estirpes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, aos antibióticos e associações testados. Tal como é descrito por outros autores (De Francesco *et al* 2007, Kumamoto *et al* 2006, Lau *et al* 2004, Sader *et al* 2003, Tankhiwale *et al* 2007, Truls *et al* 2006), estas constituem algumas das estirpes bacterianas mais comumente responsáveis pelas infecções do tracto urinário.

Os resultados obtidos demonstraram que a estirpe identificada mais vezes foi a *Escherichia coli*. A prevalência de casos foi atribuída ao sexo feminino, tanto para *Escherichia coli* como para *Klebsiella pneumoniae*. Para a *Pseudomonas aeruginosa*, os dados obtidos não permitiram inferir uma diferença entre sexos.

Os sujeitos com idades superiores aos 60 anos foram os mais afectados na colonização por qualquer uma das três estirpes. A faixa etária dos 0-10 anos foi a que registou menor número de casos tanto para *Escherichia coli* como para *Klebsiella pneumoniae*. Relativamente à *Pseudomonas aeruginosa*, o grupo menos vulnerável foi o dos 10-20 anos.

Quanto à resistência/sensibilidade aos antibióticos, foi comprovado que as quinolonas são antibióticos eficazes contra todas as estirpes bacterianas estudadas. Salienta-se uma maior eficácia da ciprofloxacina em relação à norfloxacina, quando nos reportamos à *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

As cefalosporinas de primeira geração apresentaram valores de resistência num número considerável de casos, em detrimento às de terceira geração (eficazes contra todas as estirpes bacterianas testadas). Destes resultados pôde constatar-se um aumento do número de resistências aos primeiros antibióticos, sendo que estes são também os mais administrados (Kania *et al* 2000, Kumamoto *et al* 2006, Liu & Mulholland 2005, Tankhiwale *et al* 2007).

Mediante a aplicação de nitrofurantoína, verificou-se também uma eficácia elevada, tal como descrito por outros autores (Khaikina *et al* 2007, Liu & Mulholland 2005). Obteve-se uma resistência reduzida à gentamicina (aminoglicosídeo) em comparação com a resistência à ampicilina para a *Escherichia coli*. Verificou-se um padrão de resistência simultaneamente à ampicilina, ticarcilina e nitrofurantoína, no que concerne ao tratamento de infecções por *Klebsiella*

pneumoniae. A ampicilina (penicilina) apresentou um número elevado de resistências, bem como a ticarcilina.

Pseudomonas aeruginosa é naturalmente resistente ao cotrimoxazol. O tratamento preferencial para o seu combate será uma penicilina de amplo espectro (ticarcilina ou piperacilina), combinada com um aminoglicosídeo (gentamicina ou amicacina).

Numa segunda abordagem passou-se ao estudo de casos de tuberculose pulmonar. O esquema terapêutico desta patologia implica a utilização múltipla de fármacos antibacilares. Os mais utilizados para o tratamento de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* são a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina e pirazinamida (Aragó *et al* 2006, Cohen *et al* 2002, Gunery *et al* 2004).

Dos dados observados, constatou-se um declínio acentuado do número de casos de tuberculose entre 2000 e 2003 passando a existir uma inflexão dos valores em 2004. Este facto remete para um novo incremento no número de casos.

O facto da doença ser mais frequente em grupos de adultos jovens (15 aos 44 anos), do sexo masculino, poderá ser resultado de factores sócio-comportamentais: reclusos, sem-abrigo e seropositivos (Cohen *et al* 2002).

Relativamente aos testes de sensibilidade/resistência aos antibióticos de primeira linha, em contexto ambulatorio, verificou-se existir uma elevada sensibilidade à terapêutica. Existem alguns casos de resistência a apenas um antibiótico, não tendo sido registados quaisquer resultados de multi ou poliresistências.

Constatou-se existir uma maior resistência relativamente à estreptomina, à isoniazida e à rifampicina. No caso da pirazinamida e do etambutol esta não se verificou.

Em cenário hospitalar registaram-se, no primeiro semestre de 2005, alguns casos de multi e poliresistências, sendo o número de monoresistências superior aos anteriores referidos. Contudo, continuou a ser evidente uma sensibilidade aos antibióticos.

Tal como em ambulatorio, verificou-se um grande número de resistências à estreptomina e isoniazida. Existem em menor número casos de resistência à pirazinamida, etambutol e rifampicina.

O facto de surgirem resistências aos antibacilares, pode estar relacionada com o seu modo de acção mas também com as próprias características da estirpe bacteriana, tornando-se cada vez mais necessário o recurso a medicamentos de segunda linha para combater essas mesmas infecções.

Na parte final deste trabalho, incidiu-se na revisão bibliográfica de uma terapia que poderá substituir a utilização de antibióticos no combate às doenças infecciosas: a *bacteriofagoterapia*. Os bacteriófagos, vírus que interferem com o metabolismo bacteriano conduzindo à lise da sua hospedeira (Thiel 2004), integram o grupo dos organismos mais abundantes na natureza (Ronda

et al 2003). São consumidos regularmente com os alimentos e constituem colonizadores naturais do intestino humano (Garcia & López 2002, Sulakvelidze & Morris 2001).

A sua comprovada eficácia, inocuidade (em relação aos humanos), especificidade (não interferindo na população bacteriana comensal dos organismos), adicionando o facto de se apresentarem em quantidades abundantes no ambiente (solo, alimentos, água) e de envolverem baixos custos, constituem as principais vantagens do recurso à fagoterapia (Garcia & López 2002, Parisien *et al* 2008).

Estudos realizados no passado conseguiram demonstrar a capacidade que os fagos têm na inibição do crescimento bacteriano (Fukunaga *et al* 2000), tornando-se úteis no controlo de determinadas infecções bacterianas supurativas (Slopek *et al* 1986), no tratamento da disenteria (Sulakvelidze & Morris 2001) e colites hemorrágicas (Kudva *et al* 1999), na eliminação de *Enterococcus* nosocomiais (Biswas *et al* 2002), no combate de meningites bacterianas (via nasal), tendo sido postulada a capacidade de poderem atravessar a barreira hematoencefálica (Frenkel & Solomon 2002), na indução de uma resposta anti-tumoral por parte do sistema imunitário (Pajtasz-Piasecka *et al* 2007), na capacidade na identificação dos esporos do carbúnculo *Bacillus anthracis* (Garcia & López 2002, Ronda *et al* 2003) e na detecção de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* viáveis para a realização de testes clínicos e ainda em testes de sensibilidade aos antibióticos (Yzquierdo *et al* 2006).

Desta forma pretendeu-se relacionar os dados obtidos recentemente sobre a aquisição de resistências aos quimioterápicos mais aplicados, com estudos já realizados por outros investigadores, para propor uma alternativa viável de resolução deste problema emergente.

2. Referências Bibliográficas

Aragó G. M., Belda M. A., Albert C. A., Serra S. B., Amorós Q. I., Prat F. J., Escoms T. R., González C.: **Anti-tuberculosis drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in the area of the Hospital de Sagunto from 1999 to 2004.** *Rev Clin Esp* 2006, **206** (8): 376-381.

Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel AN., Powell B., Carlton R., Merrill C.R.: **Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.** *Infect immune* 2002, **70** (1): 204-210.

Cohen T., Sommers B., Murray M.: **The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*.** *The Lancet Infectious Diseases* 2006, **3** (1): 13–21.

De Francesco M.A., Ravizzola G., Peroni L., Negrini R., Manca N.: **Urinary tract infection in Brescia, Italy- etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens.** *Med Sci Monit* 2007, **13** (6): 136-144.

Frenkel D., Solomon B.: **Filamentous phage as vector- mediated anti-body delivery to the brain.** *Proc Natl Acad USA* 2002, **99** (8): 5675-5679.

Fukunaga M., Mori K. I., Nakai T., Park S. C., Shimamura I.: **Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control.** *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66** (4): 1416-1422.

Garcia E., López R.: **Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos.** *Rev Esp Quimioterapia* 2002, **15** (4): 306-312.

Güneri S., Unsal I., Oztop A., Erkut M., Avkan Oğuz V., Ozgü A., Cakmak R.: **The resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* strains to antituberculosis drugs: evaluation of two years' data in Aegean region, Turkey.** *J Antimicrob Chemother* 2004, **38** (3): 203-212.

Kania I., Gospodarek E., Ulatowska B.: **Analysis of the bacterial strains isolated from urine samples of hospitalized and ambulatory patients.** *Med Sci Monit* 2000, **6** (6): 1122-1127.

Khaikina E. V., Reshed'ko G. K., Krechikova O. I.: **Characteristic features of etiology and antibiotic susceptibility of urinary tract infection pathogens in patients with diabetes mellitus.** *Antibiotic Khimioter* 2006, **51** (3-4): 13-18.

Kudva I. T., Jelacic S., Tarr P. I., Youderian P., Hovde C. J.: **Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157- specific bacteriophages.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65** (9): 3767-3773.

Kumamoto Y., Tsukamoto T., Matsukawa M., Kunishima Y., Hirose T., Shigeta S., Yamaguti O., Ishibashi K., Suzutani t., Yoshida H., Imafuku Y, Murai M., Watanabe K., Kobayashi Y., Uchida H., Matsuda S., Sato S., Fujime M., Fujita K., Igari J., Oguri T., Yamaguchi K., Furuya N., Deguchi T., Ishihara S.; Ooe H., Oka T., Kitamura M., Fukuhara Y., Kamidono S., Arakawa S., Humon H., Monden K., Matsumoto T., Murati T., Naito S., Egashira T., Konish T., Kohno S., Hirakata Y., Kondo A., Matsuda J., Nakano M.: **Comparative studies on activities of antimicrobial agents against causative organisms isolated from patients with urinary tract infections (2004) II.** *Jpn J Antibiot* 2006, **59** (3): 201-213.

Lau S. M., Peng M. Y., Chang F. Y.: **Resistance rates to commonly used antimicrobials among pathogens of both bacteremic and non-bacteremic community-acquired urinary tract infection.** *J Microbiol Immunol Infect* 2004, **37** (3): 185-191.

Liu H., Mulholland S. G.: **Appropriate antibiotic treatment of genitourinary infections in hospitalized patients.** *Am J Med* 2005, **118** (7A): 14-20.

Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Dus D., Weber-Dabrowska B., Zablocka A., Górski A.: **Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC- based vaccine against murine transplantable colon carcinoma.** *Immunol Lett* 2007, **116** (1): 24-32.

Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q.: **Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides.** *J Appl Microbiol* 2008, **104** (1): 1-13.

Ronda C., Lopéz R., Vasquéz M.: **Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura.** *Ver AquaTIC* 2003, **18**: 3-10.

Sader H. S., Gales A. C., Pfaller M. A., Mendes R. E., Zoccoli C. B., Jones A., Braz R. N.: **Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** *J Infect Dis* 2003, **5** (4): 200-214.

Slopek S., Weber D. B., Dabrowski M., Kucharewicz-Kurukwska A.: **Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1982-1986.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987, (35): 569-583.

Sulakvelidze A., Morris J.G. Jr.: **Bacteriophage as therapeutic agents.** *Ann Med* 2001, **33** (8): 507-509.

Tankhiwale S. S., Jalgaonkar S. V., Ahamad S., Hassani U.: **Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates.** *Indian J Med Rev* 2004, **120** (6): 553-556.

Thiel K.: **Old Dogma, new tricks st 21 Century phage therapy.** *Nature Biotechnology* 2004, **22** (1): 31-36.

Truls E. B. J., Mete Ç., Naber K. G., Stratchounski L., Svendsen M. V., Tenke P.: **Hospital acquired urinary tract infections in urology departments: pathogens, susceptibility and use of antibiotics Data from the PEP and PEAP-studies.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006, **28** (1): 91-107.

Yzquierdo S. L., Lemus D., Echemendia M., Montoro E., McNerney R., Martin A., Palomino J. C.: **Evolution of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials* 2006, **5** (4): 11
doi: 10.1186/1476-0711-5-11.