



INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE VIANA DO CASTELO

Ana Filipa Regado Calheiros

# RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO AR AMBIENTE DE ATERROS SANITÁRIOS

Mestrado de Segurança no Trabalho  
Higiene Industrial

Trabalho efetuado sob a orientação do  
Professor Doutor Paulo Alexandre da Costa Fernandes

Trabalho efetuado sob a co-orientação da  
Professora Doutora Joana Santos

Junho de 2014

Dedico este trabalho às minhas Avós, por me terem visto, com tanto orgulho, a  
iniciar esta caminhada, sem me terem visto concluí-la.

Em especial à minha querida Avó São, pelo apoio moral e afetivo em todos os  
momentos da minha vida! Pelo incentivo, enquanto presente, para que esta  
etapa fosse concluída e, agora, com a sua eterna presença espiritual, pela  
enorme energia que me permitiu finalizá-la!

## RESUMO

A avaliação de risco em atividades profissionais onde a exposição a agentes biológicos pode ser frequente e intensa, é realizada atendendo aos potenciais níveis de exposição, e, do nível de risco infeccioso dos agentes potencialmente existentes. A tendência atual de disseminação na comunidade de estirpes bacterianas portadoras de multirresistências a agentes antimicrobianos, e a possibilidade de estirpes oportunistas normalmente consideradas de risco infeccioso reduzido poderem ser portadoras desta multirresistência, são fatores de risco acrescido para este tipo de trabalhadores, cuja magnitude é nos dias de hoje praticamente desconhecida. A resistência a antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* e bactérias Gram (-) presentes em amostras de ar recolhidas em estações de recolha e triagem de resíduos foi avaliada nos estudos que se apresentam na presente tese.

Os estudos fenotípicos revelaram a existência de uma elevada percentagem de estirpes de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, antibiótico resistente às  $\beta$ -lactamases. Genotipicamente, e por RT-PCR, verificou-se que o gene *mecA* normalmente associado à resistência à meticilina estava presente em 8% das estirpes de *Staphylococcus* isoladas a partir das amostras de ar. Em nenhuma das estirpes isoladas foi possível detetar o gene *mecC*, recentemente associado também com a aquisição de resistência à meticilina, nem o gene *pvl*, presente em estirpes de *Staphylococcus* virulentas, produtoras da leucocidina de Panton-Valentine.

De 133 amostras de ar em que foi confirmada a existência de *Enterobacteriaceae*, foi possível isolar 37 estirpes bacterianas Gram (-) com resistência ao meropenemo, potencialmente produtoras de carbapenemases, sendo que 79% destas estirpes apresentaram resistência a múltiplos antibióticos de diferentes classes, nomeadamente cefalosporinas e  $\beta$ -lactâmicos.

Assim, e particularmente em atividades profissionais com indices elevados de exposição a agentes biológicos, os resultados apresentados sugerem que pode ser relevante, com alguma frequência, complementar o levantamento e quantificação da flora microbiana no ambiente de trabalho, com a realização da avaliação da presença de potenciais agentes que apresentam multirresistências. A proteção individual dos trabalhadores é de particular relevância nestes casos, já que muitas das estirpes que apresentam multirresistência são potenciais agentes oportunistas. Medidas adicionais de confinamento por forma a que os trabalhadores não sejam veículos na transmissão de potenciais agentes multirresistentes para a comunidade deve também ser considerada.

Junho de 2014

## ABSTRACT

Risk assessment in professional activities where exposure to biological agents can be frequent and intense, is performed taking into account the potential levels of exposure, and the level of infectious risk of the potentially existing agents. Nowadays we can observe an increasing trend to find multi resistant bacterial strains in the community. This fact, in conjunction with the possibility of opportunistic strains, usually considered of reduced risk of infection, may be carriers of multi-resistance, are factors of increased risk for this type of workers, whose magnitude is in today virtually unknown.

The antimicrobial resistance in strains of *Staphylococcus* and Gram negative bacteria present in air samples collected in stations of recollection and sorting of waste was assessed in studies that are presented in this thesis.

Phenotypic studies have revealed a high percentage of strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, antibiotic resistant to  $\beta$ -lactamases. Genotypically and by RT-PCR, it was found that the *mecA* gene, usually associated with methicillin resistance, was present in 8% of the *Staphylococcus aureus* strains isolated from air samples. In none of the isolated strains was detected the gene *mecC*, recently associated with the acquisition of methicillin resistance, nor the *pvl* gene, present in virulent strains of *Staphylococcus*, producers of the Panton-Valentine leukocidin.

Out of 133 air samples, in which was confirmed the existence of *Enterobacteriaceae*, it was possible to isolate 37 bacterial Gram (-) strains meropenem-resistant, potentially producers of carbapenemases. Almost 80% of these strains were resistant to multiple antimicrobial agents of different classes, namely cephalosporins and  $\beta$ -lactam antibiotics.

Thus, particularly in professional activities with high levels of exposure to biological agents, the results suggest that it may be relevant, with some frequency, to complete the quantification and identification of the microbial flora in the work environment, with the determination of the presence of potential agents displaying multi-resistances. The personal protection of workers is of particular relevance in these cases, since many of the strains that exhibit multi resistance are potential opportunistic agents. Additional containment measures, so that workers are no vehicles in the transmission of potential multi-resistant agents to the community, should also be considered.

June 2014

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Doutor Paulo Fernandes por todo o apoio e orientação ao longo da realização dos trabalhos laboratoriais e da redação da tese. Pelas sugestões construtivas e pela atitude positiva que sempre o caracterizou. Por toda a sua simpatia, disponibilidade e paciência na resposta às minhas constantes dúvidas.

Agradeço à minha co-orientadora Doutora Joana Santos pela ajuda prestada durante a realização dos trabalhos práticos e na redação da tese.

Agradeço à Engenheira Carla Ramos e ao Técnico Vítor do Laboratório do UMA, por toda a disponibilidade de tempo, meios e ajuda prestada na realização dos trabalhos laboratoriais, mas à Engenheira Carla Ramos em particular pelo tempo dispensado, em várias alturas, para me acompanhar nos procedimentos laboratoriais.

Agradeço à Luísa Imperadeiro pela sua disponibilidade e simpatia, por ter lavado e higienizado, em algumas alturas, o material que usei durante os procedimentos laboratoriais.

Agradeço ao Dr. Mota Freitas e Dra. Sandra Vieira a sua prontidão na colaboração, tornando este trabalho laboratorial possível. Em específico, à Dra. Sandra, pelo esclarecimento de dúvidas mas, maioritariamente, pela amizade demonstrada, e por todo o apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha querida família, Pai, Mãe, Irmãs, Avô e restantes familiares, por toda a compreensão demonstrada nos momentos que tive menos disponibilidade para partilhar tarefas e convívios familiares, e pelo carinho, apoio e compreensão não somente durante o curso de mestrado, mas em todos os momentos importantes de minha vida. À minha tia Manuela, pelo apoio científico e por me fazer acreditar que era capaz.

Às minhas amigas, Margarida, Cláudia, Hermínia, Ariana e Francisca pelo apoio de sempre, pelo conforto nas horas de desânimo e por me fazerem acreditar que tudo é possível. Em especial à Francisca pela disponibilidade demonstrada sendo prova da nossa amizade.

Ao meu namorado, Daniel Magalhães, pelo carinho, apoio e compreensão nos momentos de ausência ao longo deste percurso.

## Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Riscos biológicos e saúde ocupacional .....	1
1.1.1.	Legislação aplicável .....	7
1.1.2.	Atividades profissionais com risco de exposição a agentes biológicos .....	10
1.2.	Riscos emergentes – resistência a antibióticos .....	15
1.2.1.	Antimicrobianos.....	19
1.2.2.	Resistência a antibióticos – ambiente hospitalar e de cuidados de saúde .....	26
1.2.3.	Resistência a antibióticos – comunidade e atividades profissionais não relacionadas com a saúde.....	30
1.3.	Relevância e atualidade do trabalho proposto .....	32
2.	Trabalho apresentado.....	34
2.1.	Objetivo geral .....	34
2.2.	Objetivo específico .....	34
2.3.	Metodologia.....	34
3.	Materiais e Métodos.....	35
3.1.	Estirpes bacterianas e meios de cultura.....	35
3.2.	Testes de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em agar.....	36
3.2.1.	Preparação do inóculo .....	36
3.2.2.	Testes de sensibilidade a antibióticos .....	36
3.3.	Testes sensibilidade aos antimicrobianos por diluição .....	38
3.3.1.	Preparação das Placas de MH com antibiótico .....	38
3.3.2.	Diluição da suspensão do inóculo .....	38
3.3.3.	Incubação das placas.....	39
3.3.4.	Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar.....	39
3.4.	Isolamento do DNA das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp .....	39
3.5.	Deteção do gene <i>mecA</i> , <i>mecC</i> e <i>pvl</i> por RT-PCR.....	40
3.5.1.	Deteção do gene <i>mecA</i> .....	40
3.5.2.	Deteção do gene <i>mecC</i> e <i>pvl</i> .....	40
3.6.	Análise electroforética dos produtos de PCR .....	41

4.	Resultados e Discussão .....	42
4.1.	Caracterização da resistência antimicrobiana das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp isoladas a partir das amostras de ar. ....	43
4.2.	Deteção do gene <i>mecA</i> , <i>mecC</i> e <i>pvl</i> .....	54
4.3.	Estudo do perfil de resistência de bactérias resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colónias obtidas de amostras de ar .....	63
5.	Conclusões .....	77
6.	Bibliografia .....	81

## Índice de Figuras

Figura 1 - Percentagem de estirpes resistentes a cada antibiótico.....	47
Figura 2- Perfil de resistências das amostras testadas.....	52
Figura 3 – Curva de fusão de controlo positivo. ....	55
Figura 4 – Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecA</i> . ....	55
Figura 5 - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecA</i> . ....	56
Figura 6 - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecA</i> . ....	56
Figura 7 - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecC</i> e <i>pvl</i> .....	59
Figura 8 - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecC</i> e <i>pvl</i> .....	60
Figura 9 - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene <i>mecC</i> e <i>pvl</i> .....	60
Figura 10 - Percentagem de estirpes resistentes a cada antibiótico... ..	67
Figura 11 - Perfil de resistências das estirpes testadas.....	70
Figura 12 - Perfil de resistências a famílias de antibióticos.....	73



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Efeitos para a saúde de uma má qualidade do ar. ....	4
Tabela 2 - Atividade das diferentes cefalosporinas em Gram (+) e Gram (-). ...	21
Tabela 3 - Atividade das diferentes quinolonas em Gram (+) e Gram (-). ....	24
Tabela 4 - Antibióticos testados para o estudo de perfil de resistência de <i>Staphylococcus spp</i> .....	37
Tabela 5 - Antibióticos testados para o estudo de perfil de resistência das Gram (-). ....	37
Tabela 6 – Primers. ....	41
Tabela 7 - Fenótipos de resistência a antibióticos e genótipos de espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas do ar ambiente. ....	45
Tabela 8 - Prevalência da resistência antimicrobiana comum em estirpes <i>Staphylococcus spp</i> .....	47
Tabela 9 - Prevalência da resistência antimicrobiana comum nas estirpes Gram (-) isoladas. ....	66
Tabela 10 - Fenótipos de resistência a antibióticos de espécies Gram (-) isoladas do ar ambiente. ....	71

## ABREVIATURAS

AK - Amicacina

AMC – Amoxicilina – Ácido Clavulânico

AMP - Ampicilina

ARB – Bactérias resistentes a antibióticos

ARGs – Genes de resistência a antibióticos

AVC - Unidade de AVC agudo

BHI – Meio de cultura *Brain Heart Infusion*

CIM – Concentração mínima inibitória

CoNS – *Staphylococcus coagulase negativo*

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DGS – Direcção-Geral de Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HIV – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HSE- Health and Safety Executive

FOX - Cefoxitina

KF - Cefalotina

McC – Meio MacConkey

MER - Meropenemo

MH – Meio Mueller-Hinton

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

MDR – Multidrug Resistant

XDR – Extensively Drug

PDR – Pandrug Resistant

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBP1 – Proteínas de ligação à penicilina 1

PBP2 - Proteínas de ligação à penicilina 2

PS – Peptona Sal

P - Penicilina

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

SARS - Síndrome respiratória aguda grave

TSB – Meio de enriquecimento *Tryptone Soy broth*

UMA – Unidade Microbiologia Aplicada

UV – Ultra violeta

UCI - Unidade Cuidados Intensivos

UD - Unidade de Dia

## 1. Introdução

### 1.1. Riscos biológicos e saúde ocupacional

Na última década, a cobertura da comunicação social sobre riscos biológicos, como a ameaça de antraz a trabalhadores dos correios devido às atividades dos bioterroristas, o surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) que afetou os profissionais de saúde, ou a ameaça da gripe aviária para os avicultores, tem levado à sensibilização do público para os riscos provocados por agentes biológicos.

Assim, estes exemplos de riscos biológicos despertaram a atenção do público por ilustrar como nós próprios podemos contribuir para a propagação de doenças causadas por esses microrganismos, como resultado do estilo de vida de hoje e da vida profissional. Os viajantes em geral, o comércio e a migração mundial à procura de emprego podem funcionar como meio de propagação de agentes biológicos perigosos ao redor do mundo num curto espaço de tempo, fazendo com que as doenças transmissíveis cheguem rapidamente a uma dimensão pandémica (EU - OSHA, 2007).

As doenças *supra* mencionadas representam apenas alguns exemplos das muitas doenças causadas por agentes biológicos que podem ser contraídas no local de trabalho, sendo que os microrganismos infecciosos envolvem apenas uma pequena parte do grande número de agentes biológicos existentes.

De acordo com a Diretiva 2000/54/CE, os agentes biológicos são definidos como bactérias, vírus, fungos, culturas de células e endoparasitas humanos. São classificados em quatro grupos de risco de acordo com o seu nível de risco de infeção.

Para além disso, alguns agentes biológicos têm uma sensibilização e / ou potencial tóxico, que também devem ser considerados na avaliação dos riscos no local de trabalho.

Os trabalhadores em potencial contato com agentes infecciosos, nomeadamente, aqueles que exercem atividades como criação de animais, matadouros, medicina veterinária, laboratórios ou cuidados de saúde são o grupo de maior risco biológico, não sendo, porém, as únicas atividades expostas a este risco.

Com efeito, os agentes biológicos são omnipresentes. Em muitos locais de trabalho, os trabalhadores estão diariamente expostos a agentes biológicos que não causam doenças infecciosas, mas carregam um considerável potencial de risco de alergias ou toxicidade. Os bioaerossóis perigosos estão associados a uma ampla variedade de efeitos sobre a saúde. Estão presentes em muitas áreas de trabalho, especialmente em indústrias que utilizam materiais orgânicos, água ou outros líquidos, na agricultura, nas águas residuais ou nas atividades de tratamento de resíduos e, até mesmo, em escritórios localizados em edifícios com humidades ou em locais onde os sistemas de ar condicionado não são alvo de manutenção adequada.

Todavia, estes perigos são pouco conhecidos quando comparados com doenças infecciosas tais como HIV ou tuberculose (EU - OSHA, 2007).

O *Health and Safety Executive* (HSE), sediado na Grã-Bretanha, estima que, a cada ano, entre 1.500 a 3.000 pessoas irão desenvolver asma ocupacional no Reino Unido. Este número sobe para 7.000 casos/ano, se os casos de asma, relacionada com o trabalho e por este agravada, forem incluídos.

Cerca de 2.000 novos casos de infeções relacionadas com o trabalho são registados por ano. No entanto, tais números são sempre subestimados (Crook, 2007).

Um dos grandes problemas nesta questão é a diferença entre o nível de compreensão do público sobre a exposição a microrganismos na vida diária e a exposição a agentes biológicos no local de trabalho. A via de entrada dos agentes biológicos pode ocorrer por inalação, ingestão, através de cortes, pele danificada ou por transmissão sexual. Estes podem ser transmitidos por contato, de pessoa para pessoa, por vetores tais como os insetos ou outros animais, por contato com fezes contaminadas ou com outros líquidos corporais (por exemplo, sangue, saliva) e, ainda, por contato com objetos contaminados, com o solo, com aerossóis, com comida e com água.

Muitas pessoas têm conhecimento que, no seu dia-a-dia, são, constantemente, expostos a microrganismos, sendo que a maioria deles não são prejudiciais à saúde.

Quando os agentes biológicos são introduzidos nos locais de trabalho por fazerem parte do processo do mesmo, por exemplo, num laboratório ou em biotecnologia, os trabalhadores mostram, habitualmente, elevados níveis de consciência para os riscos biológicos a que estão expostos, conhecendo e usando, geralmente, as medidas de proteção adequadas.

Como tal, é-lhes dada formação em segurança e saúde no trabalho e orientação específica detalhada. Os profissionais de saúde que estão sob elevado risco de exposição a agentes biológicos inerentes ao seu trabalho, também têm altos níveis de consciência do risco associado à sua atividade.

Porém, nas situações em que os agentes biológicos, apesar de indesejáveis, são inerentes ao trabalho a prestar, como é o caso da agricultura, do tratamento de resíduos ou das atividades que envolvam águas de processos industriais ou lubrificantes de refrigeração, os trabalhadores nem sempre estão conscientes do risco de exposição.

Acresce que, além dos riscos para os trabalhadores, existe, ainda, o risco de transmissão para a comunidade.

Tal verificou-se em agosto de 2002, no Reino Unido, quando sete pessoas morreram e 180 ficaram doentes após um surto de *Legionellae* provocado por fuga em torres de arrefecimento contaminadas, não obstante existir uma abrangente orientação sobre o risco de doença do legionário.

Além do mais, no ano de 2006, houve um grande aumento na ocorrência de *Legionellae* no Reino Unido, devido ao aumento da temperatura. De facto, esta parece ser uma tendência crescente com o aquecimento global (Crook, 2007).

Na realidade, o ar que respiramos nos locais de trabalho, espaços públicos e mesmo nas nossas casas pode não ser saudável. E alguns ambientes poderão ser mesmo grandes causadores de perturbações físicas, biológicas e mentais para muitos de nós (Gomes, 2002).

Atualmente, as pessoas estão cada vez mais atentas a potenciais problemas de conforto e saúde associados a uma má qualidade do ar, sendo que a crescente consciencialização para as problemáticas ambientais também tem dado o seu contributo para esta realidade.

A contaminação ambiental exterior influencia, direta ou indiretamente, todos os espaços fechados que ocupamos. As concentrações de contaminantes do ar ambiente em espaços limitados são, de um modo geral, muito mais elevadas do que as do ar ambiente exterior (Fang et al., 2007).

O ambiente interno de qualquer edifício é o resultado da integração da disposição física do edifício, do clima, dos sistemas de aquecimento, da ventilação e do ar condicionado (AVAC), dos materiais de construção, dos ocupantes e dos contaminantes existentes no interior e no exterior do edifício.

A variedade de agentes biológicos que se podem encontrar num determinado ambiente pode ser enorme.

Assim sendo, a exposição a crescentes concentrações destes agentes cria um enorme risco para a saúde e, em particular, para os indivíduos mais sensíveis.

Os efeitos para a saúde humana de uma má qualidade do ar, geralmente não são específicos. Contudo, podem-se destacar os seguintes sintomas:

**Tabela 1** - Efeitos para a saúde de uma má qualidade do ar.

Efeitos para a saúde	Sintomas
Oculares	conjuntivite, lágrimas;
Respiratórios	congestão nasal, rouquidão, secura e dor de garganta;
Pulmonares	sensação de falta de ar, tosse seca
Dérmicos	alergias, edemas;
Gerais	vómitos, náuseas, sonolência, dores de cabeça, irritabilidade e dificuldade de concentração.

Além de todos estes sintomas, podem-se desencadear doenças como a Doença do Legionário (causada pela *Legionella*), tuberculose, gripe e até mesmo a constipação comum.

Os bioaerossóis e poeiras são considerados importantes veículos de microrganismos nos locais de trabalho.

Os bioaerossóis contêm uma variedade de microrganismos, incluindo fungos e endotoxinas. Aliás, várias doenças inflamatórias e alérgicas a que os trabalhadores estão expostos são atribuídas à sua inalação.

Os trabalhadores podem também estar expostos à inalação de poeiras sendo o tamanho das partículas um fator determinante.

Com efeito, o tamanho e a forma das partículas determinam, obviamente, a quantidade de partículas que são inaladas e/ou respiradas pelos trabalhadores e, claro, a sua maior ou menor nocividade. O tamanho (diâmetro) das partículas, define se estas são respiráveis ou inaláveis: aquelas que são inaláveis, atingem as vias respiratórias superiores, enquanto as respiráveis são mais pequenas e atingem os alvéolos pulmonares, passando para a corrente sanguínea e para outros órgãos (Corrao et al., 2012).

O crescimento da população, a urbanização, a industrialização e o desenvolvimento económico são, em simultâneo, indicativos do aumento da produção de resíduos e causadores desse mesmo incremento (Sujauddin et al., 2008).

As mudanças ambientais resultantes da atividade humana, afetam, significativamente, os sistemas ecológicos no ambiente, incluindo as comunidades microbianas (Bianca et al., 2012). E, não obstante as pesquisas realizadas envolvendo essas comunidades, continua a haver pouca informação para que os processos biológicos ocorridos num aterro de depósito de resíduos sólidos sejam bem compreendidos e analisados e, por conseguinte, os seus efeitos nos trabalhadores expostos (Uchida et al., 2009).

Para um melhor conhecimento dos processos biológicos têm vindo a ser desenvolvidas novas metodologias de rastreio, porquanto, os métodos tradicionais de rastreio através de meios de cultura seletivos não conseguem reproduzir as condições que um microrganismo requer para a proliferação no seu habitat natural. Destarte, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular trouxe novas oportunidades para a análise de estruturas e composição de espécies de populações microbianas complexas.

Para a maioria dos agentes biológicos, os níveis seguros de exposição, isto é, abaixo dos quais nenhum efeito negativo na saúde é observado, ainda não pôde ser estabelecida, tornando, por isso, impossível definir valores limites de exposição profissional (VLE).



Como tal, é improvável que seja viável, num futuro próximo, a criação de VLE. No entanto, os empregadores têm o dever de avaliar os riscos biológicos no local de trabalho e, com base na avaliação de risco, implementar as medidas de prevenção adequadas para proteger os trabalhadores contra os riscos biológicos durante o trabalho. Realizar uma avaliação de risco, sem limites de exposição ocupacional como ponto de referência é possível, por exemplo, comparando o nível de concentração efetiva com o nível ambiental normal ou com as concentrações em diferentes locais de trabalho.

Em contraste com os riscos químicos, os agentes biológicos são organismos vivos que são capazes de crescer e multiplicar-se no local de trabalho, se as condições de vida de que precisam estiverem presentes. Avaliar corretamente o risco de exposição a agentes biológicos, exige, portanto, algum conhecimento de ecologia microbiana. As informações necessárias para fazê-lo devem ser disponibilizadas àqueles que têm de realizar a avaliação de risco e compreendidas por estes (EU - OSHA, 2007).

Do exposto resulta que a exposição ocupacional a agentes biológicos pode estar associada a diferentes doenças tais como diversas infeções, doença pulmonar obstrutiva crónica, alergias, efeitos tóxicos agudos e danos fetais. Atualmente, alguns agentes biológicos são classificados como cancerígenos, tais como *Helicobacter pylori*, *Schistosoma haematobium*, *papilomavirus humano* (Corrao et al., 2012).

Estima-se que o risco biológico nos locais de trabalho é responsável por cerca de 320 000 mortes por ano no mundo e cerca de 5000 mortes na União Europeia (Driscoll et al., 2005).

O conhecimento da exposição dos trabalhadores aos contaminantes transportados por via aérea é essencial para a saúde ocupacional e para a comissão de higiene e segurança no trabalho, por forma a poder avaliar-se os perigos do local de trabalho e proteger os trabalhadores.

### 1.1.1. Legislação aplicável

O sistema legal português tem alargado, em ampla escala, a regulamentação da segurança e saúde dos trabalhadores, mormente no que diz respeito à sua promoção e prevenção.

Com efeito, tem surgido nos últimos anos uma vasta gama de legislação, a qual será repetidamente mencionada ao longo do presente estudo, que, na realidade, visa estabelecer regras de segurança e saúde dos trabalhadores, quer através de legislação geral, quer através de especial para cada atividade ou fator de risco.

Refira-se, antes de mais, a **Lei n.º 102/2009 de 10 de Setembro** que, transpondo para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 89/391/CEE do Conselho, de 12 de Junho e as suas sucessivas alterações (Diretiva n.º 2007/30/CE, do Conselho, de 20 de Junho), regulamenta o regime jurídico da promoção e prevenção da segurança e da saúde no trabalho, de acordo com o previsto no artigo 284.º do Código do Trabalho.

Procurando, fixar medidas destinadas a promover a melhoria da segurança e da saúde dos trabalhadores no trabalho, a referida **Lei n.º 102/2009 de 10 de Setembro** transpõe, ainda, outras Diretivas, complementando, por isso, a regulamentação da matéria em apreço.

A este propósito realce-se, nomeadamente, a Diretiva n.º 91/383/CEE, do Conselho, de 25 de Junho, que se debruça sobre a questão da melhoria da segurança e da saúde dos trabalhadores com contrato de trabalho a termo ou com contrato de trabalho temporário, a Diretiva n.º 92/85/CEE, do Conselho, de 19 de Outubro, relativa à implementação de medidas destinadas a promover a melhoria da segurança e da saúde das trabalhadoras grávidas, puérperas ou lactantes no trabalho e, por fim, a Diretiva n.º 94/33/CE, do Conselho, de 22 de Junho, relativa à proteção dos jovens no trabalho.

No que respeita à proteção do património genético, não podemos deixar de realçar as Diretivas que contêm prescrições mínimas de segurança e de saúde no trabalho contra os agentes químicos, físicos e biológicos, designadamente, a Diretiva n.º 90/394/CEE, do Conselho, de 28 de Junho.

Por sua vez, o **Decreto-lei n.º 347/93 de 1 de Outubro**, visa transpor para o direito interno a Diretiva n.º 89/654/CEE, do Conselho, de 30 de Novembro, a qual estipula as prescrições mínimas de segurança e de saúde para os locais de trabalho, sendo, na realidade, a primeira Diretiva especial na aceção do n.º 1 do artigo 16º da Diretiva n.º 89/391/CEE, do Conselho, de 12 de Junho.

### **Risco Biológico**

De todo o exposto resulta que os princípios gerais de promoção da segurança, higiene e saúde no trabalho, adotados pela **Lei n.º 102/2009, de 10 de Setembro**, são desenvolvidos através de legislação complementar e especial aplicável em diversos sectores de atividade económica e resultante, designadamente, da transposição para o direito interno de diretivas comunitárias.

De acordo com esta orientação, o **Decreto-Lei n.º 84/97** de 16 de Abril, estabelece as regras de proteção dos trabalhadores contra os riscos de exposição a agentes biológicos durante o trabalho, que procedem à transposição para o direito interno das Diretivas n.ºs 90/679/CEE, do Conselho, de 26 de Novembro, 93/88/CEE, do Conselho, de 12 de Outubro e 95/30/CE, da Comissão, de 30 de Junho de 1995, prevendo que a lista dos agentes biológicos classificados nos grupos 2, 3 e 4 será aprovada por portaria dos Ministros da Saúde e do Trabalho e da Solidariedade.

Nesse sentido, foi posteriormente aprovada a **Portaria n.º 405/98, de 11 de Julho**, que teve em conta as alterações técnicas mais recentes referentes à introdução do agente responsável pela encefalopatia espongiforme bovina (BSE), na classificação comunitária dos agentes biológicos e ao reforço das medidas de proteção dos trabalhadores a eles expostos.

Considerando que não foram adotadas as alterações técnicas referentes a novos agentes biológicos constantes da Diretiva n.º 97/59/CE, da Comissão, de 7 de Outubro de 1997, procedeu-se à revisão em conformidade da lista dos agentes biológicos classificados constantes na Portaria **n.º 405/98, de 11 de Julho** e tendo sido aprovada a **Portaria nº 1036/98 de 15 de Dezembro**.

A Diretiva n.º 98/81/CE, do Conselho, de 26 de Outubro, que veio alterar a Diretiva n.º 90/219/CEE, do Conselho, de 23 de Abril, visa, essencialmente, adequar os procedimentos administrativos aos riscos associados à utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados (MGM) e adaptar a diretiva ao progresso técnico. Tal matéria foi, assim, implementada, no ordenamento jurídico nacional, através do **Decreto-lei n.º 2/2001, de 04 de Janeiro**, regulando, deste modo, a utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados, tendo em vista a proteção da saúde e do ambiente.

### **1.1.2. Atividades profissionais com risco de exposição a agentes biológicos**

Existem inúmeras atividades profissionais em que o risco biológico é particularmente importante, tais como as relacionadas com a prestação de cuidados de saúde, a agricultura, a zootecnia, a área alimentar, a veterinária, a biotecnologia, o depósito e tratamento de lixos, a indústria do papel alimentar, entre outras. Este facto deve-se à variedade de tipos de exposição, ao contacto com agentes altamente perigosos, à presença de trabalhadores com o sistema imunológico mais debilitado e, portanto, mais suscetíveis ao risco (Corrao et al., 2012) e provavelmente também ao facto de serem atividades que obrigam à manipulação dos agentes biológicos ou à permanência em ambientes onde a concentração destes agentes é superior ao que normalmente acontece noutras atividades profissionais.

Os profissionais de saúde são considerados de maior risco no que diz respeito ao risco biológico, devido ao facto de estarem, permanentemente, expostos a sangue e outros fluidos biológicos. A sua exposição aos agentes infecciosos é amplamente considerada como o mais importante fator de risco ocupacional, devido à alta probabilidade de ocorrerem acidentes de trabalho que podem aumentar aquele risco de exposição a agentes infecciosos (Corrao et al., 2003). Dentro dos profissionais de saúde estão incluídos médicos, enfermeiros, enfermeiros no domicílio, dentistas, profissionais de laboratório, auxiliares ação médica, entre outros. Para além do sangue e outros fluídos biológicos, estes profissionais estão expostos a diversos outros fatores de risco como instrumentos de trabalho, resíduos hospitalares e aerossóis (Corrao et al., 2012).

A utilização intencional e deliberada de agentes biológicos está envolvida em diversos locais de trabalho, como por exemplo, em laboratórios de microbiologia, sendo que a exposição ocupacional pode ser, nestes casos, facilmente monitorizada e controlada. Pelo contrário, a avaliação do risco é difícil nos postos de trabalho em que a exposição é não intencional, nomeadamente, em atividades como a agricultura, tornando a prevenção da exposição e as medidas de proteção inapropriadas.

É em atividades como a agricultura, a criação de gado, as estações de depósito e o tratamento de esgoto, as águas residuais, a produção de móveis e a serralharia, a produção de biofuel, a produção de cigarros e charutos, o pessoal militar e o pessoal das prisões, que o risco biológico deverá ser tido em conta, pois os níveis de contacto com os microrganismos são maiores do que o normal.

A agricultura é conhecida por ser de elevado risco no desenvolvimento de doenças ocupacionais das vias respiratórias. A primeira etapa do estudo dos agricultores europeus mostrou que os produtores de suínos na Dinamarca e na Alemanha, os criadores de aves na Suíça e os trabalhadores de estufas na Espanha, apresentavam maior risco de sintomas respiratórios relacionados com o trabalho. Radon e colaboradores em 2002 desenvolveram um estudo com o objetivo de determinar os níveis de exposição a agentes biológicos relevantes em locais de trabalho agrícolas, tendo sido constatado que o nível de exposição encontrado poderia colocar os agricultores em risco de contraírem doenças respiratórias (Radon et al., 2002).

Na criação de aves, vários estudos têm sido desenvolvidos, tendo sido demonstrado que os trabalhadores dos aviários estão expostos a altos níveis de poeira orgânica e, por isso, têm uma maior prevalência de sintomas respiratórios adversos.

Todavia, a influência da idade dos frangos sobre as concentrações do bioaerossol não tem sido investigada. Para avaliar a evolução da concentração de bioaerossol durante o período de engorda, Opligger e colaboradores em 2008 quantificaram diferentes parâmetros do bioaerossol (poeira inalável, endotoxinas e bactérias) em amostras de ar provenientes das zonas de trabalho dos funcionários da casa de aves, recolhido à altura das vias respiratórias, em vários aviários da Suíça. Concluiu-se que, na ausência da utilização de proteção respiratória, os trabalhadores estavam expostos ao risco biológico, pois todos os parâmetros dos bioaerossóis avaliados encontravam-se acima do nível recomendado (Oppliger et al., 2008).

Os resíduos sólidos urbanos são uma fonte potencial de infeção por *Toxoplasma Gondii*, uma vez que podem conter excrementos de gato e carne

contaminados com o parasita. Em países em desenvolvimento, os resíduos são recolhidos nas ruas por lixeiros e depositados em estações de transferência. Depois, voltam a ser manipulados por outros trabalhadores que os transportam em caminhões para os depósitos fora das cidades. O número de trabalhadores expostos é considerável e não há informações disponíveis sobre a epidemiologia da infecção pelo *T. gondii* em pessoas expostas a resíduos sólidos urbanos. Assim, Alvarado-Esquivel e colaboradores em 2008 determinaram a prevalência da infecção e as características associadas de trabalhadores expostos a resíduos sólidos em duas cidades do México. Concluíram que, os trabalhadores expostos têm uma maior frequência de infecção, provavelmente, devido a uma maior exposição ao lixo contaminado e a deficientes práticas de higiene. Este resultado é importante, especialmente, em apanhadores do sexo feminino em idade reprodutiva, para evitar a infecção durante a gravidez (Alvarado-Esquivel et al., 2008).

A indústria do algodão também expõe os seus trabalhadores ao risco biológico. Lane et al (2006), avaliaram amostras de fibra de algodão de origens internacionais para quatro contaminantes biológicos (bactérias Gram (-), endotoxinas, fungos, e 1-3- $\beta$ -D-glucano). A correlação positiva altamente significativa entre a endotoxina e o 1-3- $\beta$ -D-glucano tem implicações para a saúde, uma vez que, a inalação simultânea destes agentes pode causar ou agravar a inflamação pulmonar (Lane and Sewell, 2006).

A indústria de biotecnologia tem-se expandido muito nos últimos 20-30 anos e tem levado a uma série de aplicações em diferentes setores de trabalho, como por exemplo, médico, farmacêutico, agrícola, químico, energético, entre outros. Hoje em dia, centenas de milhares de trabalhadores em todo o mundo estão empregados em fábricas de biotecnologia. Questões de segurança e saúde relacionados a tais atividades de trabalho são considerados relevantes para os trabalhadores, bem como para o público em geral. Em particular, quando comparada à biotecnologia tradicional, os métodos modernos de processamento de microrganismos têm dado origem a preocupação pública por poderem trazer riscos para os seres humanos e para o meio ambiente. Junto com os fatores de risco ocupacionais comuns a outras atividades de trabalho, como os físicos e químicos bem conhecidos, a peculiaridade de lidar

com microrganismos e/ou diferentes sistemas biológicos pode induzir a infeções e alterações imunológicas nos trabalhadores envolvidos.

O controlo da exposição dos trabalhadores, necessidade premente em determinadas atividades profissionais, é alcançada através de avaliações periódicas, de um controlo cuidadoso e preciso do risco, de estratégias de monitorização e implementação das medidas de confinamento e, por último, de exames de vigilância médica dos trabalhadores em risco (Ferrari et al., 2006).

A manipulação de biocombustíveis pode libertar partículas de poeira contendo altas concentrações de microrganismos perigosos, representando assim um potencial problema de saúde ocupacional. Sebastian et al., 2006, analisaram a sujidade microbiana de palha embalada e de pilhas de aparas de madeira que tinham sido armazenadas ao ar livre. Em resumo, os biocombustíveis representam recursos energéticos sustentáveis de crescente importância económica mas, ao mesmo tempo, podem causar problemas de saúde significativos. Descobriram que o armazenamento de biocombustíveis no exterior no verão aumenta a presença de microrganismos e deve, portanto, ser evitado e, que a palha ecológica continha menos microrganismos do que a palha convencional devendo ser preferida, uma vez que, reduz a exposição a agentes microbiológicos nocivos.

Reiman and Uitti, 2000, avaliaram as concentrações de microrganismos no ar e endotoxinas e poeiras totais em duas fábricas de charutos e cigarros com o objetivo de avaliar o risco de infeções respiratórias e, ainda, o papel dos humidificadores como uma fonte de microrganismos e as amostras de ar recolhidas à altura das vias respiratórias dos trabalhadores durante as diferentes fases de produção.

No estudo referido foram encontradas bactérias Gram (-), fungos mesófilos, fungos termotolerantes e actinomicetes termofílicos em concentrações mais elevadas na fábrica de charutos do que nas fábricas de cigarros.

Em concreto, os humidificadores da fábrica de charutos demonstraram ser uma maior fonte de microrganismos do que os humidificadores existentes na fábrica de tabaco.



Com efeito, nas fábricas de cigarro, foram utilizados humidificadores de vapor, denotando-se que o ar humidificado estava livre de microrganismos e as concentrações desses microrganismos eram, aí, mais baixas do que em ambientes conhecidos por ter causado alveolite alérgica (Reiman and Uitti, 2000).

Acresce, ainda, que, as fontes de água contaminadas, reservatórios e sistemas, tais como condensadores de aparelhos de ar condicionado, são conhecidas por serem as principais vias de transmissão de *Legionella* spp. Atendendo a este facto, Polat e seus colaboradores investigaram a taxa de *Legionella pneumophila* em motoristas por serem considerados profissionais de risco devido à exposição direta e prolongada ao ar condicionado e a sistemas de circulação de ar, tendo concluído que os motoristas de autocarros de longa distância estavam cronicamente expostos a este microrganismo, especialmente, os que viajam para os destinos de temperatura mais alta (Polat et al., 2007).

## **1.2. Riscos emergentes – resistência a antibióticos**

A capacidade de resistência à ação inibitória de agentes antimicrobianos de muitas espécies diferentes de bactérias tornou-se um problema global, incluindo aquelas que causam doenças nos humanos.

Tal resistência continua a espalhar-se, não só em patogênicos nosocomiais, mas também em diversos organismos adquiridos na comunidade. As medidas de controlo adequadas para a resistência de tais organismos dependem, pois, da origem da resistência (Tenover and McGowan, 1996).

Algumas metodologias têm sido aplicadas por permitirem quer estabelecer relações filogenéticas entre os microrganismos, quer determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e, ainda, identificar diversos microrganismos não cultiváveis (Gerard and Kornelia, 1998).

Deste modo, a aquisição e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos entre populações de bactérias são, atualmente, um dos problemas mais relevantes no tratamento de doenças infecciosas (Alonso et al., 2001).

Antes do século XXI, a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares.

Atualmente, a resistência bacteriana está associada a diversos ambientes e pode atingir indivíduos saudáveis (Levy, 2001).

A resistência aos antimicrobianos está a emergir numa ampla variedade de infeções nosocomiais e patogênicos adquiridos na comunidade. O surgimento e propagação de organismos multirresistentes representam a convergência de uma variedade de fatores que incluem, mutações em genes de resistência comuns que ampliam o seu espectro de atividade, a troca de informação genética entre os microrganismos, a evolução da pressão seletiva nos hospitais e comunidades que facilitam o desenvolvimento e disseminação de organismos resistentes, a proliferação e disseminação de bactérias resistentes e da incapacidade de alguns métodos laboratoriais para detetar de forma emergente fenótipos de resistência.

Há vinte anos atrás, as bactérias resistentes aos antimicrobianos eram fáceis de detetar em laboratório, porque a concentração de fármaco necessária para inibir o seu crescimento era geralmente bastante elevada e consideravelmente diferente da de estirpes suscetíveis.

Nos dias de hoje, os novos mecanismos de resistência resultam em subtis mudanças nas distribuições da população bacteriana (Tenover, 2001).

A utilização de antimicrobianos foi, possivelmente, uma das formas melhor sucedidas de quimioterapia na história da Medicina.

Na década de 1940, após a sua introdução na prática clínica, foram bastante eficientes no tratamento de bactérias patogénicas, levando muitos a acreditar que as doenças infecciosas seriam um problema controlado e que se tornariam num problema do passado.

Acontece, porém, que o rápido surgimento de bactérias resistentes, especialmente as multirresistentes, durante as últimas décadas, mostrou a nossa falta de conhecimento sobre a evolução e sobre os processos que ocorrem nos ecossistemas microbianos (Aminov, 2009).

A resistência aos agentes antimicrobianos apresenta uma crescente ameaça à saúde pública global, envolvendo todos os principais patogénicos microbianos (Levy and Marshall, 2004).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se entender como a bactéria se pode desenvolver. Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como, a sua localização e diversidade são fundamentais para se entender os fatores envolvidos na resistência.

A resistência pode ser considerada um fenómeno ecológico, que ocorre como resposta da bactéria a um estímulo ambiental. As bactérias possuem alta capacidade de adaptação a condições adversas e a agentes químicos. Essa capacidade é adquirida por meio de mutações e troca de material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes (Guimaraes et al., 2010).

Embora seja classicamente atribuída a mutações cromossômicas, a resistência é mais comumente associada a elementos extracromossomais adquiridos de outras bactérias no ambiente. Estes incluem os diferentes tipos de segmentos de DNA móveis, tais como, plasmídeos, transposões e integrações (Aleksun and Levy, 2007). Apesar destes mecanismos variarem de microrganismo para microrganismo, a resistência é adquirida através de alguns fatores básicos: a inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas (Wright, 2005); a modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico (Lambert, 2005); as mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem a sua modificação química; a transformação do alvo – algumas bactérias tornam-se insensíveis a alguns antibióticos porque são capazes de transmitir a inativação de uma determinada enzima, ou seja, os antibióticos com mecanismos de ação que envolvem inibição enzimática tornam-se inativos por não terem o alvo para atuar (Guimaraes et al., 2010).

A resistência a antimicrobianos é uma consequência inevitável de adaptação evolutiva dos microrganismos e o uso abusivo de drogas antimicrobianas tem levado ao rápido aumento de resistência tanto em microrganismos patogênicos como em comensais (Silbergeld et al., 2008).

Como os antibióticos entram no ecossistema podem afetar a evolução da estrutura da comunidade (Aminov and Mackie, 2007). Para além da poluição química que provocam, o seu uso pode induzir o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos (ARB) e dos genes de resistência a antibióticos (ARG), que trazem riscos para a saúde de seres humanos e animais (Thiele-Bruhn and Beck, 2005). Grandes quantidades de antibióticos são libertados para as águas residuais municipais devido ao metabolismo incompleto nos seres humanos ou por eliminação de antibióticos não utilizados (Nagulapally et al., 2009). Como resultado, ambos ARB e ARGs foram detetados em amostras de águas residuais (Auerbach et al., 2007; Brooks et al., 2007; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b).

Atualmente o número de estirpes bacterianas com resistência a uma lista extensiva de agentes antimicrobianos de várias classes é já muito elevada e a tendência é de crescimento (Caplin et al., 2008; Kim et al., 2007; Kummerer, 2004; Schluter et al., 2007; Watkinson et al., 2007).

O *Staphylococcus aureus* tem sido desde há muito reconhecido como um importante patogénico humano responsável por uma ampla gama de infeções. Embora a introdução de antibióticos nos últimos 50 anos tenha reduzido a taxa de mortalidade provocada por *S. aureus*, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a todos os agentes antimicrobianos que tinham sido produzidos. A introdução da penicilina ofereceu uma oportunidade para tratar com sucesso graves infeções por *S. aureus*.

No entanto, no mesmo ano em que houve o primeiro sucesso clínico com penicilina, uma enzima produzida por *S. aureus*, penicilinase (mais tarde designada por  $\beta$ -lactamase) foi descrita. Esta enzima foi responsável pelas falhas clínicas que surgiram logo após a introdução da penicilina. Durante o início dos anos 50, uma série de penicilinas semi-sintéticas que apresentavam resistência à ação das  $\beta$ -lactamases foram desenvolvidas. Com o decorrer do tempo, vários fármacos foram sendo criados para ultrapassar a resistência aos antibióticos e, por volta de 1959 surgiu a meticilina, uma penicilina semi-sintética que, ao contrário da penicilina G usada até à data, não era destruída pelos *Staphylococcus* resistentes. Um ano após a sua introdução, o primeiro *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) foi detetado e a primeira falha clínica do tratamento de *S. aureus* com meticilina foi descrita (Hardy et al., 2004).

Em 1975, e maioritariamente em doentes toxicodependentes com endocardites por infeções venosas, começaram a ser isoladas estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina. Durante as décadas de 80 e 90, a resistência aos antibióticos generalizou-se pelo mundo todo. Em 2001, os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, MRSA, tinham uma prevalência baixa, embora existissem casos de surtos epidémicos em hospitais, que obrigaram a medidas drásticas por parte das organizações de forma a evitar a sua dispersão (Osswald, W. 2001).

### 1.2.1. Antimicrobianos

Os antibióticos ocorrem naturalmente ou por produção humana, e são amplamente utilizados para melhorar a saúde humana, animal e das plantas, e para a prevenção e tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas. Entre estas aplicações fundamentais e apesar do facto de que os antibióticos são largamente proibidos como promotores de crescimento na produção animal, podem ser utilizados como aditivos de forragem e, como medicamentos coccidiostáticos na indústria avícola (Cabello, 2006; Kummerer, 2009b; Singer et al., 2003). Esta amplitude de aplicações tem causado um aumento no consumo de antibióticos (Aminov, 2009; Wright, 2007).

Os primeiros antibióticos eram de origem natural, enquanto atualmente são obtidos sobretudo por síntese química (compostos antimicrobianos sintéticos). São divididos em diferentes classes, tais como:  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas, aminoglicosídeos, carbapenémicos e cefalosporinas (Kummerer, 2009a).

Os agentes antimicrobianos são frequentemente classificados de acordo com seu principal mecanismo de ação. Os mecanismos incluem interferência com a síntese da parede celular ( $\beta$ -lactâmicos e agentes glicopeptídicos), a inibição da síntese de proteínas (macrólidos e tetraciclina), interferência com a síntese do ácido nucleico (fluoroquinolonas e rifampicina), a inibição de uma via metabólica (trimetoprim-sulfametoxazole), e perturbação da estrutura da membrana bacteriana (polimixinas e daptomicina). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes à classe de agentes antimicrobianos, ou podem adquirir resistência através de uma nova mutação ou adquirindo um gene de resistência de outros organismos. Os genes de resistência adquirida podem ativar uma bactéria para produzir enzimas que destroem o agente antibacteriano, para expressar os sistemas de efluxo de drogas que evitam que seja atingido o seu alvo intracelular, para modificar o local alvo onde atua determinado antibacteriano, ou para produzir uma via metabólica alternativa

que evita a ação do fármaco. Aquisição de novo material genético por bactérias sensíveis a antimicrobianos a partir de estirpes de bactérias resistentes pode ocorrer por conjugação, transformação ou transdução, com transposições a facilitar muitas vezes a incorporação dos genes que conferem múltipla resistência no genoma do hospedeiro, ou plasmídeos. O uso de agentes antibacterianos cria uma pressão seletiva para o aparecimento de estirpes resistentes (Tenover, 2006).

#### **1.2.1.1. $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos devido à sua eficácia terapêutica e à baixa toxicidade tornaram-se no grupo de antibióticos existente mais importante.

O sítio de ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são as proteínas envolvidas na síntese da parede celular das bactérias, mais especificamente do peptidoglicano. Estas proteínas, normalmente designadas por PBPs, possuem uma elevada afinidade para a ligação dos agentes  $\beta$ -lactâmicos, resultando essa ligação numa inibição da função das PBPs na síntese da parede celular (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

O facto destes antibióticos poderem ser inativados por  $\beta$ -lactamases, faz com que este grupo não seja eficaz em alguns microrganismos.

As estirpes de *Staphylococcus aureus* que possuem *mecA* codificam para uma transpeptidase, PBP2a, que tem a particularidade de possuir uma baixa afinidade para  $\beta$ -lactâmicos inclusive meticilina (Utsui and Yokota, 1985). Acredita-se que os MRSA evoluíram de *S. aureus* meticilina sensível (MSSA), através da aquisição de elementos genéticos móveis, conhecido como a cassete cromossómica (SCCmec). SCCmec possui o complexo do gene *mec* e vários genes de resistência a vários antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (Hardy et al., 2004).

Dentro do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos temos as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.

**1.2.1.1.1. Carbapenémicos**

Os Carbapenémicos diferem na sua estrutura dos outros  $\beta$ -lactâmicos e são antibióticos de largo espectro por terem uma boa penetração, boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases e forte ligação às PBPs (Sousa, 2005). São eficazes em bactérias Gram (+) e Gram (-), pois ligam-se às PBP1 e PBP2 provocando o alongamento e a lise celular (Jorgensen and Sahm, 1995).

Como exemplos temos o imipenemo, meropenemo e ertapenemo.

**1.2.1.1.2. Cefalosporinas**

As cefalosporinas são derivadas de produtos de fermentação da *Cephalosporium acreminium* e constituem um grande e valioso grupo de antimicrobianos utilizados em clínica. A sua atividade antibacteriana e as suas propriedades farmacológicas e metabólicas são alteradas por substituições nas posições 7 e 3 respetivamente (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005).

O seu mecanismo de ação é similar ao das Penicilinas. Ligam-se a PBPs específicas que atuam como recetores farmacológicos nas bactérias, interferindo com a síntese do peptidoglicano da parede celular e por fim ativação de enzimas autolíticas na parede celular que podem produzir lesões que levam à morte celular (Jawetz et al., 1989).

Classificam-se em 4 gerações de acordo com o respetivo espectro bacteriano.

**Tabela 2** - Atividade das diferentes cefalosporinas em Gram (+) e Gram (-). Adaptado de (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005)

<b>Geração Cefalosporina</b>	<b>Gram (+)</b>	<b>Gram (-)</b>	<b>Alguns Exemplos</b>
<b>1ª geração</b>	Boa atividade	Pouca atividade	Cefalotina, cefazolina, cefalexina
<b>2ª geração</b>	Alguma atividade	Boa atividade	Cefamandole, cefaclor, cefuroxima, cefoxitina
<b>3ª geração</b>	Menor atividade que 1ª e 2ª geração	Muito boa atividade	Cefotaxima, ceftadizima, ceftriaxona
<b>4ª geração</b>	Boa atividade	Boa atividade	Cefpime, cefpiroma,



### **1.2.1.2. Aminoglicosídeos**

Aminoglicosídeos podem ser usados em tratamentos provocados por bactérias Gram (-) e Gram (+). São ineficazes contra anaeróbios (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005).

São antibióticos inibidores da síntese proteica que se associam a alvos ribossomais para poderem exercer as suas propriedades. Atuam na síntese da parede celular bacteriana, através de ligação irreversível à subunidade ribossomal 30S, que após ligação, a célula não consegue fazer a tradução do mRNA durante a síntese proteica, levando à morte celular (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005).

Estes antibióticos apresentam várias vantagens como, estabilidade metabólica, rápida ação bactericida, largo espectro de ação, raro desenvolvimento de resistência bacteriana, pequeno risco de alergias e baixo custo, continuam a ser largamente utilizados, em associação com outros antibióticos no tratamento de bacterémias Gram (-) multirresistentes por exemplo (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

ex. Neomicina, Gentamicina, Amicacina.

### **1.2.1.3. Sulfonamidas**

As sulfonamidas foram os primeiros agentes antimicrobianos usados nos Estados Unidos durante a década de 30 (Jorgensen and Sahm, 1995). O mecanismo de ação é a inibição competitiva da utilização do ácido p-aminobenzoico (PABA) (Jawetz et al., 1989). São fármacos bacteriostáticos, impedindo o crescimento bacteriano por carência de ácido fólico. São ativos contra bactérias Gram (+) e Gram (-), bem como determinados protozoários e alguns fungos (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

Existem diversos mecanismos de resistência bacteriana, concentração intracelular baixa dos fármacos por impermeabilização da membrana externa ou devido a bombas de efluxo, por mutação, por resistência adquirida (Sousa, 2005).

Em *Enterobacteriaceae* têm sido descritos os genes *sul 1*, *sul 2* e *sul 3* responsáveis pela resistência as sulfonamidas (Sousa, 2005).

#### 1.2.1.4. Macrólidos

Os macrólidos são de origem natural, produzidos por espécies de *Streptomyces* spp. Atuam ao nível da subunidade 50S do ribossoma bacteriano, inibindo a síntese proteica por inibição da transpeptidase/translocação, tendo portanto efeitos bacteriostáticos (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

São antibióticos com espectro relativamente amplo, com atividade em bactérias Gram (+), algumas bactérias Gram (-), *Mycoplasmas*, *Chlamydiae*, *Treponemas* e *Rickettsiae* (Jorgensen and Sahm, 1995).

Têm sido descritas resistências bacterianas intrínsecas e adquiridas, sendo a mais frequente designada por MLS<sub>B</sub>, atribuída ao gene *erm*. Existem no entanto mais fenómenos de resistência através de impermeabilidade dos invólucros bacterianos, inativação enzimática, bombas efluxo e modificação do alvo por metilases e por mutação (Sousa, 2005).

Ex. Eritromicina, Azitromicina, etc.

#### 1.2.1.5. Quinolonas

As quinolonas são análogos sintéticos do ácido nalidíxico. São ativas contra bactérias Gram (-) e Gram (+) (Jawetz et al., 1989). O seu modo de ação envolve a inibição da síntese do DNA bacteriano por bloqueio da enzima DNA-girase ou topoisomerase IV (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

Nas bactérias Gram (-) as quinolonas inibem a DNA girase, codificada pelos genes *gyr A* e *gyr B*, enquanto nas Gram (+) inibem a topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE* (Sousa, 2005).

As quinolonas classificam-se em 4 gerações.

**Tabela 3** - Atividade das diferentes quinolonas em Gram (+) e Gram (-). Adaptado de (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005)

<b>Geração Quinolonas</b>	<b>Gram (+)</b>	<b>Gram (-)</b>	<b>Alguns Exemplos</b>
<b>1ª geração</b>	Praticamente sem atividade	Moderada atividade	Ác. Nalidíxico
<b>2ª geração</b>	Limitada atividade	Boa atividade	Ciprofloxacina, ofloxacina
<b>3ª geração</b>	Boa atividade	Boa atividade	Levofloxacina, gatifloxacina
<b>4ª geração</b>	Muito boa atividade	Boa atividade	Trovafloxacina

A resistência bacteriana é conseguida através de impermeabilização da OM, efluxo do antibiótico e mutação das enzimas alvo (Sousa, 2005).

#### 1.2.1.6. Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro (Jorgensen and Sahm, 1995), inibindo o crescimento de bactérias Gram (+) e Gram (-), aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas (Sousa, 2005). Atuam ao nível da subunidade 30S dos ribossomas bacterianos, inibindo a síntese proteica bacteriana (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

Embora de largo espectro tem sido observada elevada prevalência de resistência às tetraciclina, sendo o principal mecanismo de resistência mecanismos de efluxo. A resistência é mais frequente em plasmídeos e transposões, podendo ser também de origem cromossómica. Em *Enterobacteriaceae* e cocos Gram (+) a resistência é mediada principalmente por transposões (Sousa, 2005).

Ex. Tetraciclina, Doxicilina, etc.

#### **1.2.1.7. Anfenicóis**

Este grupo compreende o cloranfenicol, que é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces venezuelae*. Atua na subunidade 50S ribossomal, sendo portanto um antibiótico bacteriostático, inibidor da síntese proteica (Jawetz et al., 1989; Sousa, 2005).

Tem amplo espectro de atividade, atuando contra bactérias Gram (+), Gram (-) (Jorgensen and Sahm, 1995; Sousa, 2005).

A resistência é frequente quer em bactérias Gram (+) como Gram (-), sendo o principal mecanismo de resistência a modificação enzimática do cloranfenicol. No entanto existem outros processos de resistência, mutação do alvo ribossomal, impermeabilização bacteriana ao antibiótico e existência de bombas de efluxo, estas no entanto menos frequentes (Sousa, 2005).

### **1.2.2. Resistência a antibióticos – ambiente hospitalar e de cuidados de saúde**

Os organismos que causam infecção nosocomial são frequentemente resistentes a agentes antimicrobianos. Os principais fatores que levam ao aumento da prevalência de microrganismos resistentes em hospitais são mudanças nos organismos causadores de infecção nosocomial (em parte devido a mudanças nas características das populações hospitalares e dos procedimentos e instrumentos utilizados na assistência ao paciente), aumento da prevalência de resistência em bactérias causadoras de infecção adquirida na comunidade, e a utilização de agentes antimicrobianos. A relação entre o uso de antibióticos e resistência de organismos hospitalares é apoiada pela associação consistente e variação simultânea em várias populações, a presença de um padrão dose-resposta, e a existência de um modelo biológico razoável para explicar a relação. A maior influência na emergência de bactérias hospitalares resistentes incluem efeitos antimicrobianos em indivíduos tratados, mecanismos de transferência de resistência entre bactérias, e as vias de transmissão para as bactérias dentro do hospital ou os seus fatores de resistência (McGowan, 1983).

As infecções nosocomiais nos hospitais representam a maior preocupação com a saúde, tanto para os utentes como para os funcionários hospitalares, especialmente tendo em vista a disseminação de resistências a antibióticos entre bactérias. Os pacientes imunocomprometidos estão especialmente sujeitos a infecções por microrganismos oportunistas. Muitas bactérias são responsáveis por infecções nosocomiais (por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*) e inúmeros casos são relatados todos os dias (Gilbert et al., 2010).

Enquanto algumas formas têm sido propostas para descrever a transmissão dessas infecções, como a disseminação por contato (Beggs et al., 2008; Hota, 2004) e microrganismos existentes no ar (Beggs et al., 2008; Shiomori et al., 2001; Tang et al., 2006), poucos estudos têm sido desenvolvidos sobre as

fontes desses microrganismos no ar dos quartos dos hospitais (Hota, 2004; Li and Hou, 2003; Tang et al., 2006).

Gilbert et al., 2010, avaliaram a biodiversidade microbiana de bioaerossóis nos quartos de hospitais ocupados recentemente numa unidade de pneumologia. Amostras ambientais e isolados foram também analisadas para identificação de genes de resistência a antibióticos. Os biofilmes dos lavatórios também foram estudados para avaliar se os ralos constituíam uma potencial fonte de bioaerossóis neste ambiente e um reservatório para as bactérias oportunistas e genes de resistência a antibióticos. *Stenotrophomonas maltophilia* foi, de longe, o microrganismo mais frequente no biofilme, seguido por *Enterobacter cloacae*. Foram identificados genes de resistência à eritromicina em todas as amostras de ar recolhidas nos quartos do hospital, e genes de resistência à tetraciclina pontualmente. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as bactérias dos ralos não foram aerossolizadas em concentração significativa. Continuam a ser uma preocupação devido ao risco de transmissão associada à sua presença (Gilbert et al., 2010).

A resistência antimicrobiana é crescente em quase todos os patógenos associados aos cuidados de saúde. Fridkin et al., 2002, examinaram as mudanças na prevalência de resistência durante 1996-1999, em 23 hospitais, nos Estados Unidos da América. Foram observados aumentos significativos na prevalência da resistência, mas apenas para *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente, *Pseudomonas aeruginosa* resistente à ciprofloxacina, e *Escherichia coli* resistentes à ciprofloxacina ou ofloxacina. Estes aumentos foram significativos apenas em doentes fora da unidade de cuidados intensivos (UCI). Segundo estes autores, as diferenças de fatores presentes fora das UCIs, tais como o uso de quinolonas excessiva, ou práticas inadequadas de controlo de infeção, podem explicar as tendências observadas (Fridkin et al., 2002).

Um dos fatores de aparecimento de resistência antimicrobiana pode advir também do uso indiscriminado de antimicrobianos em diferentes serviços das unidades de saúde. Dancer e colaboradores em 2006, analisaram quais os microrganismos ambientais de três serviços diferentes, unidade cuidados intensivos (UCI), unidade de AVC agudo (AVC) e da unidade de dia (UD) e

compararam as resistências antimicrobianas, em associação com o uso de antimicrobianos. Foram encontradas associações entre o consumo de grupos de antibióticos selecionados e resistências correspondentes entre *Staphylococcus* e bacilos Gram (-). A resistência antibacteriana foi a única diferença significativa entre as bactérias ambientais dos diferentes serviços (Dancer et al., 2006).

Por outro lado, continua a ser debatida a importância da limpeza hospitalar em relação ao aumento do número de pacientes que adquirem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Num ambiente hospitalar, há pouca evidência direta para a eficácia da limpeza. A higiene hospitalar é geralmente avaliada visualmente, não sendo possível dessa forma avaliar o risco microbiológico. No entanto, a limpeza já foi aceite como um fator importante no controle de outros patógenos ambientais resistentes, como o *Clostridium difficile*, enterococos resistentes à vancomicina, *Norovirus*, e *Acinetobacter* spp. O *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) pode ser propagado por pessoas e superfícies hospitalares, podendo levar à contaminação do meio ambiente e contribuir potencialmente para a transmissão de infeções hospitalares adquiridas. Dancer e colaboradores em 2008, mostraram que uma boa higienização pode ter mais impacto sobre o controle de MRSA do que se pensava, sendo que a introdução de serviços de limpeza adicionais é mais fácil do que o cumprimento de uma eficaz higienização das mãos (Dancer, 2008).

A extensão para a qual a transferência horizontal de genes de virulência, que contribuiu para o surgimento de estirpes virulentas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) no hospital e na comunidade, tem ainda muito para esclarecer. Um grupo de investigadores analisaram poeiras de pré-filtros de purificadores de ar de salas de isolamento de um hospital por PCR, para identificar a presença de genes de resistência a antibióticos associada a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e *Staphylococcus* coagulase negativos. Foram detetados em várias amostras genes de resistência a três classes de antibióticos (*aac* (6')- *aph* (2''), *ermA* e *mecA*), indicando a presença de material genético e, igualmente de células de MRSA multirresistente e outros *Staphylococcus* no ar hospitalar, e que os purificadores de ar independentes podiam reduzir os níveis no ar destes

contaminantes. A pesquisa para *vanA* foi negativa. Estes resultados sugerem ainda que o pó pode servir como um importante reservatório de elementos genéticos que podem conferir resistência aos antimicrobianos (Drudge et al., 2012).

O aparecimento de resistência a múltiplas drogas em *Enterobacteriaceae* em ambiente hospitalar é também de particular preocupação. Kao e colaboradores em 2010, desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a suscetibilidade antimicrobiana e avaliar a presença do gene *ampC* em três membros da família *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, e *Serratia marcescens*) encontrada num Hospital Geral de Veteranos, em Taichung, durante 5 anos, utilizando a técnica de PCR. Foi avaliada a resistência das três famílias de *Enterobacteriaceae* a cinco antimicrobianos, ceftazidima, flomoxef, imipenem, moxifloxacina e colistina. Dos 90 isolados, 53 (58,9%) foram positivos no teste de triagem para ESBL. Genes de resistência foram detetados em 12 (22,6%) destes isolados (Kao et al., 2010).

Os resíduos dos serviços de saúde suscitam polémica quanto à importância para a saúde humana, animal e ambiental. Nascimento e colaboradores em 2009, avaliaram a existência de bactérias clinicamente relevantes em resíduos de serviços de saúde num aterro sanitário e o seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os resultados permitiram sugerir que bactérias viáveis nos resíduos de serviços de saúde representam riscos à saúde humana e animal. A existência de linhagens multirresistentes nos resíduos de serviços de saúde sustenta a hipótese de que estes atuem como reservatórios de marcadores de resistência, com impacto ambiental. A falta de tratamento e destino destes resíduos podem expor diferentes populações a riscos de transmissão de doenças infecciosas associadas a microrganismos multirresistentes (Nascimento et al., 2009).



### **1.2.3. Resistência a antibióticos – comunidade e atividades profissionais não relacionadas com a saúde**

O risco biológico e a resistência aos antibióticos são pouco tidos em consideração fora dos ambientes hospitalares. No entanto, é de potencial relevância em atividades profissionais onde os níveis de contacto com microrganismos são maiores que o normal.

Recentemente, alguns estudos têm vindo a ser desenvolvidos de modo a nos darem informação acerca da qualidade dos ambientes de trabalho, presença de bactérias, resistência das mesmas a antibióticos e a potencialidade de transmissão destas aos humanos.

As bactérias do género *Aeromonas* podem estar presentes em ambientes de água doce, salgada e salobra. Algumas espécies podem ser patogénicas ao homem, causando gastroenterites e outras infeções. Danielle e colaboradores em 2011, isolaram, identificaram e quantificaram *Aeromonas hydrophila* isoladas de esgoto e lodo tratado, e pesquisaram a presença dos genes de virulência e resistências a  $\beta$ -lactâmicos. Os resultados sugeriram que *A. hydrophila* pode resistir ao processo de tratamento de esgoto e lodo, e além disso pode apresentar diversos genes de virulência e resistência a antibióticos, motivos pelos quais a *A. hydrophila* pode ser uma ameaça para a saúde pública (Oliveira, 2011).

A avicultura é uma atividade onde a resistência a antibióticos também está presente. Price e seus colaboradores, desenvolveram um estudo cujo objetivo foi avaliar o risco de colonização e transmissão de *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos em avicultores, comparando-se com referenciais comunitários. Os avicultores apresentaram 32 vezes mais hipótese de possuírem *E. coli* resistente à gentamicina comparando com referenciais comunitários, para além de terem um risco significativamente mais aumentado de possuírem *E. coli* multirresistentes. A exposição ocupacional a *E. coli* resistente na indústria de frango, pode ser uma importante via de entrada de *E. coli* resistente na comunidade (Price et al., 2007).

Friese e colaboradores desenvolveram em 2012 um estudo cujo objetivo foi investigar de forma abrangente a existência de MRSA no ar ambiente de celeiros e no ambiente do alojamento de explorações suinícolas dos diferentes tipos de produção, para obter mais informações sobre a potencial transmissão por via aérea de MRSA nas quintas de animais. Foram analisadas amostras de ar ambiente, amostras ambientais (poeiras, fezes, alimentos, sendo recolhidas de 5 locais distintos do celeiro) e amostras recolhidas dos próprios animais (amostra nasal e pele). Em 85,2 % das amostras de ar de todos os celeiros foram detetados MRSA. O conhecimento sobre as formas de transmissão de MRSA na produção pecuária ainda é escasso. Este estudo proporciona uma boa referência de que poderia haver transmissão de MRSA dentro de rebanhos suínos, indicando uma possível contaminação do ambiente dos celeiros (Friese et al., 2012).

Recentemente o MRSA ST398, surgiu em animais de produção e agricultores. Graveland e colaboradores em 2010, investigaram os fatores associados à colonização por MRSA em vitelos e nos humanos que trabalham e vivem nessas quintas. Para tal, uma amostra de 102 quintas de vitelas foram selecionadas, os agricultores das quintas foram convidados a preencher um questionário para identificar possíveis fatores de risco e foi feito um esfregaço nasal a cada participante. Foram também recolhidos esfregaços nasais dos vitelos e testadas as amostras para verificar a presença de MRSA. A presença de MRSA em humanos foi fortemente associada com a intensidade do contacto com animais e com o número de MRSA positivos em animais nas quintas (Graveland et al., 2010).

Natália Canal estudou isolados de *E. coli* provenientes de água da Lagoa dos Patos, tendo sugerido a existência de uma correlação entre a presença de elementos genéticos integrativos como integrão de classe 1 e a presença de bombas de efluxo no aparecimento de isolados multirresistentes aos antimicrobianos (Canal, 2010).

### 1.3. Relevância e atualidade do trabalho proposto

A caracterização do perfil de resistências a antibióticos de um microrganismo é importante porque mesmo que não se trate uma bactéria patogénica, poderá tornar-se em patogénica oportunista. Por outro lado, o fenómeno de transferência horizontal de genes reveste-se de especial importância aumentando assim a relevância de estudos que identifiquem nos microrganismos existentes as resistências que estes apresentam.

Ao longo da história, a humanidade foi vítima de pandemias de cólera, peste, gripe, febre tifoide, tuberculose e outras doenças infecciosas, que muitas vezes tornavam-se as principais causas de morte.

Apesar do aparecimento de vacinas e antimicrobianos eficazes, os microrganismos continuam a ganhar a batalha na guerra contra as infeções. Estes ainda acarretam expressiva mortalidade e morbidade, especialmente em países em desenvolvimento. Um dos principais motivos para esta situação é o surgimento e a disseminação da resistência microbiana, que tende a aumentar com o uso indiscriminado de antibióticos. Trata-se de um problema que afeta a saúde individual e coletiva e traz grande preocupação a todos os profissionais envolvidos na assistência à saúde.

Segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010, foram registados, em cerca de 60 países, perto de 440 mil novos casos de tuberculose resistente a diferentes tipos de medicamentos, além de 150 mil novos óbitos. O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), é uma superbactéria que, segundo estimativas, é responsável pela morte de 19 mil pessoas a cada ano nos Estados Unidos - muito mais do que o HIV (Mogato M. and E., 2011).

Como consequência do crescimento alarmante da resistência em todo o mundo, a OMS decidiu, em 2011, utilizar o Dia Mundial da Saúde (7 de abril) para chamar a atenção para o avanço da resistência microbiana. Com a campanha “Sem ação hoje, não há cura amanhã”, convocou governos, formuladores de planeamento e de políticas de saúde, autoridades sanitárias, prescritores, farmacêuticos, representantes da indústria de medicamentos,

pacientes e o público em geral para pensar sobre o combate à resistência antimicrobiana, a assumir sua responsabilidade, a agir e desenvolver práticas para prevenir e conter a situação (Chan, 2011).

Além do uso irracional dos antibióticos, a doença e a resistência a ela associada também proliferam em condições de instabilidade civil, pobreza, migração em massa e degradação ambiental, em que grande número de pessoas é exposto às doenças infecciosas, aliada à ineficiência dos serviços de saúde.

Outra fonte de resistência microbiana é o abastecimento de alimentos e está relacionado aos agentes infecciosos que proliferam na comida e bebida ingerida.

Existem hoje mais de 150 compostos com ação antimicrobiana, mas desde 1970, não foi descoberta nenhuma nova classe de antibióticos.

A pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos podem levar de dez a vinte anos, mas a vida útil de um antibiótico pode ser muito fugaz devido à resistência microbiana.

Têm sido desenvolvidos vários estudos de pesquisa de resistências de bactérias a antimicrobianos quer na saúde, quer na área alimentar. Na qualidade do ar ambiente, e a influência destas resistências na saúde dos trabalhadores expostos a estes microrganismos, os trabalhos desenvolvidos são muito escassos.

Atendendo a que, esta problemática é do interesse da saúde pública e de todos nós que estamos expostos, quer nos nossos trabalhos, quer nas nossas casas a este fator de risco biológico, é pertinente o desenvolvimento deste estudo, uma vez que contribui para um melhor conhecimento dos níveis de exposição de um grupo de trabalhadores a riscos potenciais normalmente não tidos em consideração nestas áreas de trabalho.

## **2. Trabalho apresentado**

### **2.1. Objetivo geral**

Identificação de potenciais perigos biológicos normalmente não tidos em consideração em situações de avaliação de risco, em particular de trabalhadores particularmente expostos a agentes biológicos, como em estações de recolha e triagem de resíduos e aterros sanitários.

### **2.2. Objetivo específico**

Avaliação da resistência a antibióticos numa população de microrganismos isolados a partir de amostras de ar ambiente de centros de recolha e aterros sanitários, identificando bactérias presentes no ar ambiente com resistência a antimicrobianos particularmente relevantes do ponto de vista clínico.

### **2.3. Metodologia**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada – UMA, do Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

O trabalho dá continuidade a um estudo previamente desenvolvido, com a recolha de amostras de ar e crescimento da flora microbiana em meios gerais. Algumas estirpes já isoladas foram caracterizadas em termos de resistência no presente trabalho.

O trabalho realizado tem 3 vertentes práticas que incidem:

1. Caracterização da resistência antimicrobiana das estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas a partir das amostras de ar, sendo que 48 estirpes são coagulase negativas e 1 estirpe é coagulase positiva.
2. Estudo do perfil de resistência de bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colónias obtidas de amostras de ar.
3. Deteção do gene *mecA*, gene *mecC* e do gene de virulência *pvl* em estirpes de *Staphylococcus* por PCR.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Estirpes bacterianas e meios de cultura

##### Estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas a partir de amostras de ar

Foram testadas 49 estirpes identificadas como *Staphylococcus* spp e preservadas a -70°C em meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) com 15% (V/V) de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany). As estirpes foram regeneradas em 5 ml de meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 37°C (Sanyo Incubator, Japan) durante a noite. Após inoculação com ansa em placas de Petri (Ø= 90 mm) com meio TSA (Biokar Diagnostics) e incubação a 37°C (Sanyo Incubator, Japan), durante 18-24h, foram isoladas colônias usadas posteriormente nos testes de sensibilidade a antibióticos.

##### Estudo do perfil de resistência de bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colônias obtidas de amostras de ar

As culturas mistas provenientes da análise bacteriológica de ar ambiente de aterros sanitários, preservadas a -70°C em PBS foram descongeladas de um dia para o outro à temperatura de 4°C. Após manutenção durante uma hora a 30°C (Certomat H, BBraun) as culturas foram regeneradas em meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) por inoculação de 100µl de cada suspensão de colônias em 5 ml meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) com 2mg/L meropenemo (Sigma Aldrich, Germany). Após incubação a 37°C (Sanyo Incubator, Japan) durante 18-24h, foi realizada uma sementeira por esgotamento em meio MacConkey (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) contendo 2mg/L meropenemo (Sigma Aldrich). As placas foram incubadas durante 18-24h a 37°C (Sanyo Incubator, Japan). As colônias obtidas foram repicadas para placas com meio TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) e incubadas 18-24h a 37°C (Sanyo Incubator, Japan). Todas as colônias isoladas, morfologicamente diferentes, foram preservadas em meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) com 15% (V/V) de glicerol para posterior caracterização de sensibilidade a agentes antimicrobianos.

### **3.2. Testes de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em agar**

A suscetibilidade a agentes antimicrobianos foi testada de acordo com as normas CLSI e EUCAST (Cockerill et al., 2012; EUCAST, 2014; Ferraro et al., 2012; Leclercq et al., 2013)

#### **3.2.1. Preparação do inóculo**

A partir das colônias isoladas em TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), retiraram-se 4 ou 5 colônias bem isoladas e de aspeto morfológico idêntico. As colônias foram ressuspensas em solução NaCl (VWR, Pennsylvania, USA) estéril a 0,85% (P/V). Após homogeneização no vortex (Stuart Scientific CO, Great Britain), a turbidez (Biolog, USA) foi medida e a concentração da suspensão acertada até à sua turbidez corresponder à da solução padrão de 0,5 MacFarland.

#### **3.2.2. Testes de sensibilidade a antibióticos**

As placas de MH (Oxoid, England) foram inoculadas com o inóculo preparado anteriormente, com uma zaragatoa de forma a preencher totalmente a placa.

Os discos dos antibióticos, armazenados no congelador a  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  foram retirados e colocados à temperatura ambiente 1h antes de serem utilizados.

Os discos (Oxoid, England) foram colocados com a ajuda de uma pinça e a pelo menos a 1.5 cm de distância uns dos outros e da parede da placa de Petri. Os halos de inibição foram lidos após  $18 \text{ h} \pm 2\text{h}$  de incubação, segundo guia da EUCAST (EUCAST, 2014).

Para a caracterização da resistência antimicrobiana das estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas, foram usados os antibióticos constantes da tabela 4.

**Tabela 4** - Antibióticos testados para o estudo de perfil de resistência de *Staphylococcus* spp.

Classe	Antibiótico	Dose/disco ( $\mu$ )
Penicilinas	Ampicilina	10
	Amoxicilina + ácido clavulânico	30
Glicopeptídeos	Vancomicina	30
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5
Macrolídeos	Eritromicina	15
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10
	Amicacina	30
	Rifampicina	5

Para o estudo do perfil de resistência de bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colônias obtidas de amostras de ar, foram testados os seguintes antibióticos:

**Tabela 5** - Antibióticos testados para o estudo de perfil de resistência das Gram (-).

Classe	Antibiótico	Dose/disco ( $\mu$ )
Cefalosporinas	Neomicina	10
	Cefoxitina	30
	Cefalotina	30
Penicilinas	Ampicilina	10
	Penicilina	10
	Amoxicilina + ácido clavulânico	30
Glicopeptídeos	Teicoplanina	30
	Vancomicina	30
Fluoroquinolonas	Ácido Nalidíxico	30
	Ciprofloxacina	5
Macrolídeos	Eritromicina	15
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10
	Amicacina	30
Tetraciclina	Tetraciclina	30
	Rifampicina	5
Carbapenemos	Meropenemo	10



### **3.3. Testes sensibilidade aos antimicrobianos por diluição**

A suscetibilidade a agentes antimicrobianos pelo método de diluição foi testada de acordo com as normas CLSI e EUCAST (Cockerill et al., 2012; EUCAST, 2014; Ferraro et al., 2012; Leclercq et al., 2013)

#### **3.3.1. Preparação das Placas de MH com antibiótico**

O agar Mueller-Hinton foi preparado a partir de uma base desidratada (Oxoid, Basingtoke, United Kingdom), seguindo as instruções do fabricante. Após autoclavado, durante 15' a 121°C, deixou-se arrefecer até aproximadamente 60°C e adicionou-se a solução do antibiótico preparado de acordo com o descrito nas Normas CLSI (Cockerill et al., 2012), e entrando em consideração com os dados fornecidos pelo fornecedor relativamente à pureza e potência do antibiótico. Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de Petri (diâmetro 90mm) até uma altura aproximada de 4-5 mm.

Para os testes de sensibilidade à oxacilina foram preparados meios de MH desidratada (Oxoid, Basingtoke, United Kingdom) e após autoclavagem foi adicionada oxacilina com as concentrações de 0,25mg/L, 0,5mg/L, 1mg/L, 2mg/L e 4mg/L.

Para o *screening* de bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo (Sigma Aldrich, Germany) foram preparados meios de MH com as concentrações de meropenemo (Sigma Aldrich, Germany) de, 2mg/L, 3mg/L, 4mg/L, 8mg/L e 9mg/L, e também BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) com 2mg/L de meropenemo (Sigma Aldrich, Germany).

#### **3.3.2. Diluição da suspensão do inóculo**

Para se fazer a inoculação usaram-se ansas calibradas de 1µl, e a suspensão de células com uma turbidez equivalente à solução padrão MacFarland 0,5 foi diluída 1:10 em solução PS (Merck, Germany) estéril para se obter uma concentração de  $10^7$  UFC/mL. A aplicação de 1µl desta diluição permitiu assim obter um inóculo final  $10^4$  UFC de acordo com as recomendações CLSI. A inoculação de cada amostra foi feita para todas as concentrações de antibiótico

a serem testadas. As suspensões ajustadas foram usadas na inoculação final até 15 minutos após a sua preparação (Cockerill et al., 2012).

### **3.3.3. Incubação das placas**

As placas inoculadas permaneceram à temperatura ambiente até os inóculos serem absorvidos pelo meio, num tempo nunca superior a 30 minutos. A seguir, as placas foram invertidas e incubadas (Sanyo Incubator, Japan), a 37° C, por um período de 18±4h.

### **3.3.4. Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar**

As placas foram colocadas numa superfície escura, não refletiva, para determinar os pontos finais. A CIM foi registada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando-se qualquer colónia única ou turvação leve causada pelo inóculo.

## **3.4. Isolamento do DNA das estirpes de *Staphylococcus* spp**

As culturas de *Staphylococcus* spp. testadas, preservadas a -70°C em BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) com 15% de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany), foram regeneradas em meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 37°C (Sanyo Incubator, Japan) durante a noite. A partir desta pré-cultura, 1 ml de uma cultura em BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), crescida a 37°C durante 18-24h foi centrifugada a 10 000xg durante 10 min (Hettich, Mikro 20, Germany). O isolamento do DNA foi realizado usando o *kit* Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) e de acordo com o descrito pelo respetivo fabricante, tendo a lise das células de *Staphylococcus*, sido realizada após incubação durante 1 h a 37°C com uma solução de lisozima a 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Germany) na presença de EDTA 50mM (Sigma Aldrich, Germany).

Após precipitação com isopropanol e centrifugação a 10 000 x g, o *pellet* de DNA foi reidratado a 4°C *overnight* adicionando-se 100µl de solução de reidratação (Promega, USA).

### 3.5. Detecção do gene *mecA*, *mecC* e *pvl* por RT-PCR

A deteção da presença dos genes *mecA*, *mecC* e *pvl* foi realizada por PCR em tempo real (RT-PCR, Biorad CFX96™ – Real Time System).

As reações de amplificação foram realizadas num volume total final de 13 µl contendo 6,5 µl de SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, USA), 3 µl de solução de DNA e 50 pmol de cada primer (ver tabela 6).

#### 3.5.1. Detecção do gene *mecA*

Os primers utilizados nesta reação foram *mecA1* e *mecA2* (Murakami et al, 1991). A reação de amplificação decorreu ao longo de 30 ciclos com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação), 50 s a 55°C (emparelhamento) e 30 s a 72°C (extensão). Um passo final de extensão a 72 durante 10 min foi realizado. Os primers V3F e V3R (Muyzer et al., 1993) foram usados para controlo interno da amplificação.

A curva de desnaturação foi realizada entre 75°C e 95°C com incrementos de 0,2 °C e leituras com intervalos de 10 s.

#### 3.5.2. Detecção do gene *mecC* e *pvl*

Os primers utilizados nesta reação foram, 5'-GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3' e 5'-GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC-3' para o *mecC* e 5'-GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT-3' e 5'-GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG-3' para o *pvl*. A reação de amplificação decorreu ao longo de 30 ciclos com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 15 s. a 95°C (desnaturação), 60 s a 59°C e 60 s a 72°C. Um passo final de extensão a 72 durante 10 min foi realizado.

Os primers V3F e V3R foram usados para controlo interno da amplificação.

A curva de desnaturação foi realizada entre 75°C e 95°C com incrementos de 0,2 °C e leituras com intervalos de 10 s.

**Tabela 6 – Primers.**

Designação	Sequência	Gene Alvo	Produto gerado (tamanho em pb)	Referência
<b>mecA1</b>	5`-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3`	<i>mecA</i> nuceotídeo 1281 a 1303	533pb	(Murakami et al., 1991)
<b>mecA2</b>	5`-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3`	<i>mecA</i> nuceotídeo 1793 a 1814		
<b>V3F</b>	5' - CCTACGGGAGGCAGCAG - 3'	16S rDNA	193pb	(Muyzer et al., 1993)
<b>V3R</b>	5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'	16S rDNA		
<b>mecC F</b>	5'-GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3'	<i>mecC</i>	138pb	(Institute, 2012)
<b>mecC R</b>	5'-GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC-3'	<i>mecC</i>		
<b>PVL F</b>	5'-GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT-3'	<i>lukF-PV</i>	85pb	(Institute, 2012)
<b>PVL R</b>	5'-GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG-3'	<i>lukF-PV</i>		

### 3.6. Análise electroforética dos produtos de PCR

Após amplificação, os produtos de PCR (5 µl) em tampão Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, USA) foram analisados em gel de agarose (Sigma Aldrich, Germany) 1,5% (P/V) em TBE 1x com brometo de etídeo 0,5µg/ml (Sigma Aldrich, Germany).

A eletroforese decorreu numa tina de eletroforese (Stratagene) durante 2h a 50V constantes, tendo o gel sido visualizado por transiluminação de UV (UVIttec limited, England). Como padrão de peso molecular foi utilizado o  $\lambda$  *HindIII* (Promega, USA).

#### 4. Resultados e Discussão

No âmbito de um projeto anteriormente realizado, “Avaliação de riscos biológicos em Unidades de Recolha Seletiva e Aterro Sanitário” foram obtidas e analisadas um total de 409 amostras de ar recolhidas em Unidades de recolha de vidro, triagem de papel, triagem de embalagens e um aterro sanitário. A incidência de *Staphylococcus* apesar de variável, confirmou-se como sendo a mais predominante entre as espécies bacterianas identificadas (entre 25-80% das espécies identificadas nas amostras estudadas). As estirpes de *Staphylococcus* foram inicialmente isoladas em meio AN (Agar Nutritivo) e posteriormente em meio Baird Parker Agar (BPA) com confirmação do teste de coagulase com plasma de coelho. A identificação foi apenas realizada fenotipicamente e até ao género. As estirpes de *Staphylococcus* isoladas, num total de 49, foram preservadas a -70°C e alvo do presente estudo, tendo sido realizada a análise fenotípica do perfil de resistência de estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas, e para as estirpes resistentes à oxacilina a deteção do gene *mecA* e do seu homólogo *mecC* por RT-PCR.

A análise das amostras de ar referida permitiu ainda verificar a presença de *Enterobacteriaceae* em 133 das amostras analisadas. Estas, preservadas a -70°C foram alvo de teste e foi feito o estudo do perfil de resistência dos isolados resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colónias obtidas de amostras de ar do mesmo projeto.

Considerando a potencialidade dos resíduos como agentes de disseminação de microrganismos potencialmente patogénicos para os seres humanos e outros animais, além de veículo para disseminação de marcadores de resistência a antimicrobianos, à semelhança das espécies identificadas nas amostras de ar e do trabalho proposto, Nascimento e colaboradores em 2009, avaliaram a ocorrência de bactérias relevantes nos resíduos, tendo encontrado estirpes de grande relevância clínica como *Enterobacteriaceae*, e *Staphylococcus* coagulase negativo, e resistentes a vários antimicrobianos (Nascimento et al., 2009).

Goldstein e colaboradores em 2012, avaliaram a presença de MRSA e MSSA em estações de tratamento de águas residuais nos Estados Unidos, tendo a incidência de MRSA aumentado. Estes resultados levantam potenciais problemas de saúde pública para os trabalhadores (Goldstein et al., 2012).

Os trabalhadores de estações de tratamento de resíduos orgânicos podem estar expostos a uma variedade considerável de agentes biológicos, como bactérias, endotoxinas, fungos alergénicos e parasitas. No entanto, as características do trabalho podem ser muito diferentes de acordo com parâmetros como a tipologia dos materiais de entrada, processos de tratamento operacionais, condições meteorológicas da zona. Num estudo ocupacional, Lavoie e colaboradores em 2006, reportaram uma concentração média até 50.300 e 101.700 UFC/m<sup>3</sup> de bactérias e fungos respetivamente, no Quebec (Canadá). Solans e colaboradores em 2007 encontraram concentrações de fungos e bactérias Gram (-) na sala de triagem (412.000 e 5280 UFC/m<sup>3</sup>, respetivamente), enquanto os níveis mínimos encontrados nos espaços circundantes foram de 750 e 85 CFU/m<sup>3</sup>, respetivamente. Em 2009, Nadal e colaboradores, desenvolveram um estudo semelhante e encontraram bactérias Gram (-) numa concentração de sensivelmente 2000 UFC/m<sup>3</sup>.

A exposição a bioaerossóis no ambiente de trabalho está associada a uma ampla gama de efeitos de saúde com impacto importante na saúde pública, incluindo doenças infecciosas, efeitos tóxicos agudos, alergias e cancro. Os sintomas respiratórios e alterações na função pulmonar são as mais estudadas e, provavelmente, os efeitos mais importantes na saúde associadas aos bioaerossóis (Douwes et al., 2003).

#### **4.1. Caracterização da resistência antimicrobiana das estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas a partir das amostras de ar.**

As estirpes isoladas, num total de 49 foram alvo de testes de sensibilidade a antimicrobianos de diferentes categorias tendo-se testado nomeadamente a resistência a Ampicilina, Eritromicina, Amicacina, Vancomicina, Rifampicina, Gentamicina, Ciprofloxacina e Oxacilina, sendo que o perfil de resistência aos

diferentes antibióticos encontrados nas diferentes estirpes foi o constante da tabela 7.

**Tabela 7** - Fenótipos de resistência a antibióticos e genótipos de espécies de *Staphylococcus* isoladas do ar ambiente.

Isolados*	Fenótipo de resistência					
	β-lactâmicos (AMP, AMC, OXA)	Glicopeptídeos (VA)	Fluoroquinolonas (CIP)	Macrolídeos (E)	Aminoglicosídeos (CN, AK)	Outros (RD)
B416				E		RD
B418						
B419						
B420	OXA					
B421		VA				
B422	OXA				AK	
B425						
B432	OXA					
B433				E		
B439	AMP, OXA			E		
B469	OXA					
B475	AMP, OXA					
B484	AMP, OXA		CIP	E	CN	RD
B490						
B494	OXA					
B501	AMP, AMC, OXA				CN	
B502	OXA					
B503						
B114	AMP					
B 116						
B 117	AMP			E		
B118	OXA					
B120	AMP			E		
B124	OXA					
B 126						



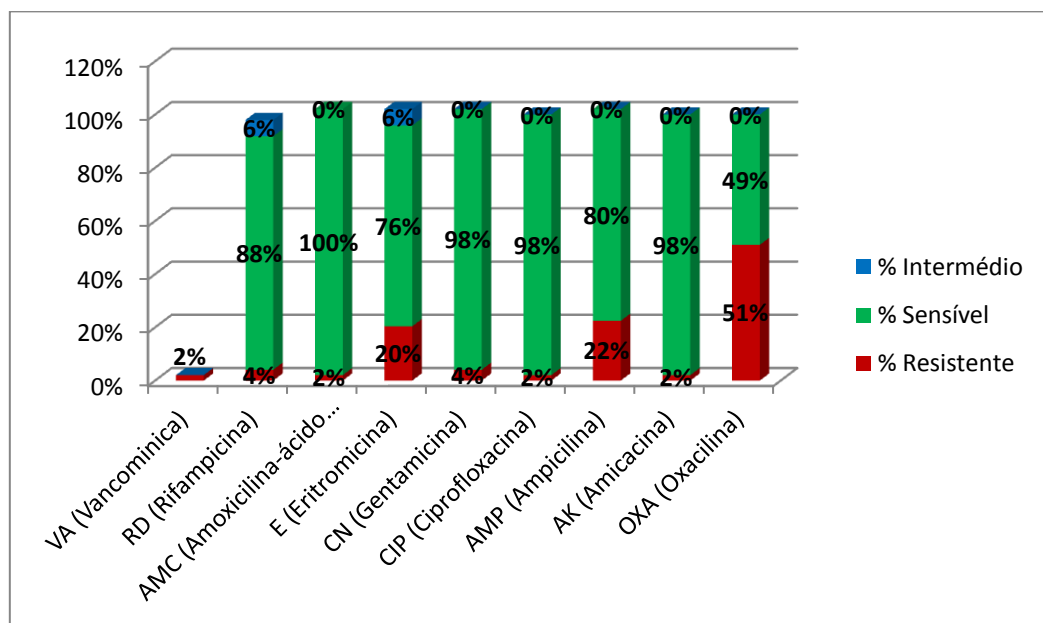
Isolados	Fenótipos					
	$\beta$ -lactâmicos (AMP, AMC, OXA)	Glicopeptídeos (VA)	Fluoroquinolonas (CIP)	Macrolídeos (E)	Aminoglicosídeos (CN, AK)	Outros (RD)
<b>B 131</b>	AMP					
<b>B133</b>	AMP					
<b>B139</b>	OXA					
<b>B143</b>						
<b>B144</b>				E		
<b>B145</b>						
<b>B146</b>						
<b>B 148</b>	AMP					
<b>B153</b>	OXA			E		
<b>B155</b>						
<b>B156</b>	OXA					
<b>B 160</b>	OXA					
<b>B161</b>	OXA					
<b>B162</b>	OXA					
<b>B163</b>	OXA			E		
<b>B 165</b>	OXA					
<b>B166</b>						
<b>B 169</b>	OXA			E		
<b>B171</b>	OXA					
<b>B 176</b>	OXA					
<b>B 180</b>	AMP					
<b>B201</b>	OXA					
<b>B 206</b>	OXA					
<b>B 208</b>						

\* código da estirpe na coleção da UMA

**Tabela 8** - Prevalência da resistência antimicrobiana comum em estirpes *Staphylococcus* spp.

		Nº estirpes (CoNS) isoladas resistentes aos antimicrobianos
Penicilinas	Ampicilina	11 (22,9%)
	Amoxicilina + ácido clavulânico	1 (2,1%)
	Oxacilina	25 (52,1%)
Glicopeptídeos	Vancomicina	1 (2,1%)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	1 (2,1%)
Macrolídeos	Eritromicina	10 (20,8%)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	2 (4,2%)
	Amicacina	1 (2,1%)
	Rifampicina	2 (4,2%)

Das 49 estirpes testadas, 48 são coagulase negativas e apenas uma estirpe é coagulase positiva, sendo que esta foi sensível a todos os antibióticos testados. A incidência de resistência nas estirpes coagulase negativas é apresentada na tabela 8.

**Figura 1** - Percentagem de estirpes resistentes a cada antibiótico.

Bhargava and Zhang, 2012, estudaram a multirresistência antimicrobiana em *Staphylococcus* coagulase negativo em comida animal, em que todas as estirpes testadas apresentaram resistência à oxacilina. A resistência a outros

dois antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi igualmente alta, 79,3% para ampicilina e 91,9% para penicilina. Obtiveram também 67,8% resistentes à tetraciclina e 36,8% à eritromicina. Os restantes antibióticos testados, como a ciprofloxacina e gentamicina, entre outros, apresentaram baixa prevalência de resistência (Bhargava and Zhang, 2012). À semelhança do descrito anteriormente, dos 13 antimicrobianos testados por Fontes e colaboradores em 2013, observaram que os antibióticos com percentagens de resistência bacteriana mais elevada foram penicilina G, oxacilina, e eritromicina com 67% (Fontes et al., 2013). Nascimento e colaboradores, também observaram um importante índice de resistência de *Staphylococcus* coagulase negativo à oxacilina (Nascimento et al., 2009).

Das 49 estirpes de *Staphylococcus* spp testadas, 25 demonstraram ser resistentes à oxacilina com MICs que variaram entre 0,5mg/L a 4mg/L, sendo que 12 possuía um MIC superior a 2mg/L. A resistência a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mostrou ser sensivelmente mais baixa que o reportado noutros estudos (Bhargava and Zhang, 2012; Fontes et al., 2013; Nascimento et al., 2009). As estirpes analisadas demonstraram ainda possuir baixo nível de prevalência de resistência a gentamicina e ciprofloxacina, 4% e 2% respetivamente. De todas as estirpes testadas 13 (26,5%) demonstraram sensibilidade a todos os antibióticos usados.

Das 49 estirpes testadas, 32 foram resistentes a pelo menos um antibiótico  $\beta$ -lactâmico (65,3%), 25 foram resistentes apenas a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (51%), e 8 amostras foram resistentes a  $\beta$ -lactâmicos e qualquer outro antimicrobiano (16,3%). De todas as estirpes testadas, apenas três apresentaram resistência a pelo menos três antibióticos, sendo que destas apenas uma estirpe apresentou resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos considerando-se como tal multirresistente, de acordo com a classificação por Magiorakos et al. (Bhargava and Zhang, 2012; Magiorakos et al., 2012).

Em janeiro de 2006, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) publicou novos critérios interpretativos para a resistência do *S. aureus* à vancomicina. Os *breakpoints* foram reduzidos de  $\leq 4\mu\text{g/ml}$  a  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  para sensíveis, de 8 a  $16\mu\text{g/ml}$  para 4 a  $8\mu\text{g/ml}$  para o intermédio, e de  $\geq 32\mu\text{g/ml}$  a  $\geq 16\mu\text{g/ml}$

para resistente. Os *breakpoints* para a vancomicina para *Staphylococcus* coagulase negativo não foram alterados. No entanto, o método de difusão por disco não fornece resultados de confiança, pois não diferenciam entre *S. aureus* sensíveis à vancomicina e vancomicina intermédios, e em estirpes coagulase negativas não distingue entre estirpes com suscetibilidade à vancomicina intermédia e resistentes. O método das diluições sucessivas pode ser utilizado para determinar a suscetibilidade à vancomicina, contudo os resultados positivos requerem confirmação (Cockerill et al., 2012).

Já sendo comum a resistência à meticilina, Karchmer avaliou a resistência à vancomicina em *Staphylococcus* coagulase-negativos, tendo observado que a taxa de resistência à vancomicina aumentou de 1,8 % em 1995 para 4,1% e 5,0% em estirpes isoladas em 1996 e 1997, respetivamente (Karchmer, 2000). Em 2009, Swenson e colaboradores determinaram a resistência de estirpes de *Staphylococcus* à vancomicina. Todos os isolados, independentemente do MIC ser 4 ou 8 µg/ml foram classificados como sensíveis à vancomicina pelo método de difusão em disco (diâmetro de zona  $\geq 15$ mm) (Swenson et al., 2009)

Considerando o trabalho de Swenson e colaboradores, e usando os mesmos valores para as estirpes de *Staphylococcus* testadas, apenas uma das estirpes demonstrou resistência a este antibiótico, ou seja existe uma sensibilidade a este antibiótico em 98% dos isolados. Na figura 2 apresenta-se um resultado resistente, pois essa amostra teve crescimento total, não tendo sido observado nenhum halo de inibição. No entanto, o teste de difusão de disco não permite distinguir entre estirpes sensíveis à vancomicina e estirpes intermédias. (Swenson et al., 2009)

De acordo com a Norma 004/2013 da DGS, estes microrganismos consideram-se “alerta”, por apresentarem um padrão de resistência ou resistência intermédia a antimicrobianos pouco habituais ou de baixa prevalência em Unidades de Saúde, como é o caso da vancomicina em *Staphylococcus aureus*. Neste estudo, a estirpe resistente à vancomicina é *Staphylococcus* coagulase negativa, mas no entanto um potencial reservatório de resistência à droga.

Hope e colaboradores, avaliaram a evolução da prevalência de CoNS resistentes à meticilina de 2001 para 2006 na Irlanda e Reino Unido. A

prevalência variou de 54,2% para 79,9% e foi fortemente relacionada com a multirresistência em CoNS. Os índices de resistência em MRCoNS foram 67,1% para ciprofloxacina, 80,2% eritromicina, 73,4% gentamicina, 99,1% penicilina, 19,2% rifampicina, entre outros, e apenas um isolado foi não-suscetível à vancomicina com um MIC de 8 mg/L, indicando, assim, a resistência a este antibiótico (Hope et al., 2008). Segundo este estudo, a resistência a aminoglicosídeos, macrólidos, quinolonas e tetraquinolonas está fortemente associada com a resistência à meticilina em ambos os grupos. A prevalência de resistência à meticilina, encontrada por Hope e colaboradores, é mais prevalente em CoNS do que em *S. aureus*, sendo que o significado clínico de MR CoNS é um pouco mitigado por baixa patogenicidade, no entanto, tem sido sugerido que CoNS podem atuar como um reservatório de genes de resistência que possam disseminar para *S.aureus*. Portanto, a vigilância continuada de CoNS justifica-se. *Staphylococcus* resistente à meticilina e multirresistentes não são apenas um problema no Reino Unido, mas sim em todo o Mundo (Hope et al., 2008).

Devido aos tratamentos prolongados e ao elevado uso de vancomicina na prática clínica pode surgir a disseminação da resistência à vancomicina nos humanos. A vancomicina é muito utilizada nos hospitais no tratamento de infecções por *Staphylococcus*, uma vez que a incidência de estirpes resistentes à meticilina e também a todos os  $\beta$ -lactâmicos é bastante elevada. O aparecimento de estirpes com resistência intermédia à vancomicina (VISA) ou resistentes à vancomicina (VRSA), que no nosso caso é no mínimo de 2%, já que as outras estirpes não foram classificadas por não estarem definidos os limites, deve ser considerado de preocupação, segundo orientações da DSG, uma vez que os trabalhadores dos aterros em estudos podem adquirir a resistência dos microrganismos existentes no meio ambiente. Uma vez adquirida pela comunidade trabalhadora pode ser disseminado para a comunidade em geral e por consequência tornar-se um problema de saúde pública. Ao contrário de *S. aureus*, no entanto, as bacterémias por CoNS tendem a ser transitórias, e muitas vezes resolvem-se naturalmente, se a fonte de infecção for removida (Hope et al., 2008).

Todas as estirpes testadas, resistentes à rifampicina são também resistentes à eritromicina (E) em 4% das amostras, seguida da gentamicina (CN), ciprofloxacina (CIP), ampicilina (AMP) e oxacilina (OXA) com 2%.

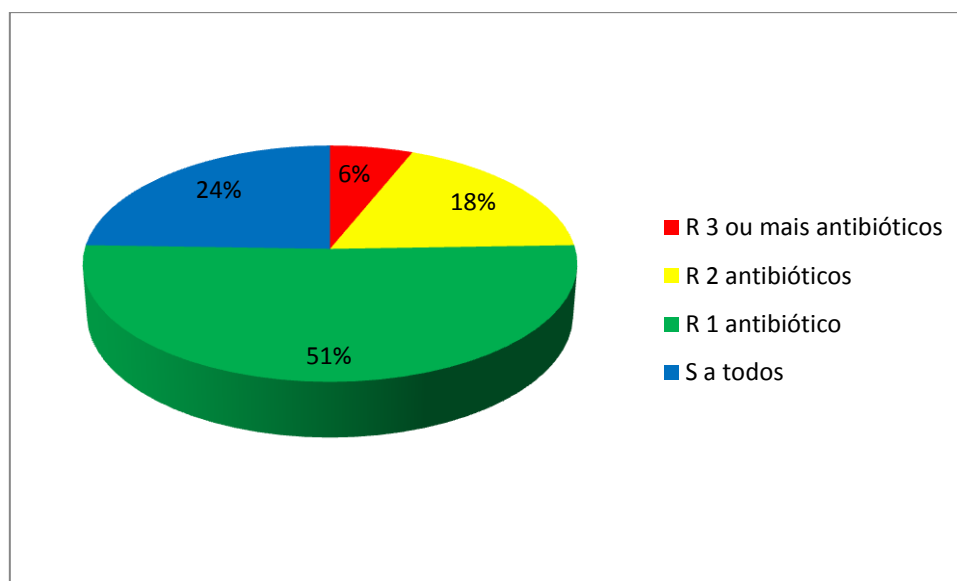
Resultados idênticos foram encontrados por Bhargava e colaboradores em 2012, em que a incidência de resistentes à rifampicina foi baixa, e aparece conjuntamente com resistência a  $\beta$ -lactâmicos, ciprofloxacina e gentamicina, tal como o obtido por nós. A única divergência é na simultaneidade com eritromicina, em que no presente estudo é onde está a maior incidência (Bhargava and Zhang, 2012).

Dos 20,8% de estirpes resistentes à eritromicina, 10% são também resistentes à oxacilina (OXA), seguido da ampicilina (AMP) com 8%, rifampicina (RD) com 4% e por último ciprofloxacina (CIP) e gentamicina (CN), sendo esta de 2%.

Na associação da ampicilina (AMP) com os restantes antibióticos, todas as amostras resistentes à ampicilina são também resistentes à oxacilina (OXA) e eritromicina (E) em 8% das amostras, seguida da gentamicina (CN) de 4%, e da rifampicina (RD), amoxicilina – ácido clavulânico (AMC) e ciprofloxacina (CIP), estes de 2%.

Apesar de aparentemente elevada a prevalência de estirpes resistentes à oxacilina, 51%, na realidade a frequência de resistência encontrada aos restantes  $\beta$ -lactâmicos estudados foi baixa. Ao contrário dos dados obtidos por Bhargava e colaboradores em 2012 e Fontes e colaboradores em 2013, na nossa população de 51% de estirpes resistentes à oxacilina, apenas 8% são resistentes à ampicilina e 2% à amoxicilina-ácido clavulânico. A maior prevalência de estirpes resistentes em simultâneo com a oxacilina é a eritromicina com 10%.

Relativamente ao perfil de resistência das amostras estudadas:



**Figura 2-** Perfil de resistências das amostras testadas.

Da análise da figura anterior, podemos verificar que das amostras estudadas temos 24% de amostras multirresistentes, sendo que de 18% destas são resistentes a 2 antibióticos e 6% a 3 ou mais antibióticos. Com resistência a um antibiótico temos 51%, e sem resistência nenhuma apenas 24%.

Diferentes critérios têm sido usados na literatura para classificação da resistência das estirpes bacterianas (Bhargava and Zhang, 2012; Magiorakos et al., 2012).

No entanto, Magiorakos et al., criaram em 2012, uma terminologia internacional padronizada com o qual descrevem os perfis de resistência adquirida em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, *Enterobacteriaceae* (exceto *Salmonella* e *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Todas estas bactérias são frequentemente responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde e são propensas a multirresistência.

Segundo Magiorakos e colaboradores, a resistência bacteriana pode ser classificada em MDR, PDR e XDR, em que MDR é definida como não

suscetibilidade a pelo menos 1 antibiótico em 3 ou mais classes de antibióticos; XDR, definida como não – suscetibilidade em pelo menos 1 antibiótico em todas as classes exceto 2 ou menos; e PDR, definido como não suscetibilidade a todos os antibióticos em todas as classes (Magiorakos et al., 2012).

Extrapolando-se estas orientações para *Staphylococcus* coagulase negativos, CoNS, e considerando os antibióticos testados, apenas uma estirpe, B484, pode ser classificada como MDR (apresentou resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos), e como possível XDR uma vez que pode apresentar resistência para os antibióticos não testados. No entanto, e considerando a gama de antibióticos sugeridos por Magiorakos na sua classificação de resistência para estirpes de *Staphylococcus aureus*, várias outras estirpes poderiam ser consideradas potencialmente como MDR já que apenas 40% dos antibióticos foram testados em relação ao sugerido pelo autor.

De acordo com o critério de Zhang e colaboradores, para os isolados multirresistentes, em que classificam estirpe multirresistente quando resistente a 3 ou mais antibióticos, pode-se dizer que neste estudo encontramos 6% de estirpes multirresistentes.

Relativamente a antibióticos usados da mesma família, nos grupos avaliados verifica-se que relativamente às penicilinas há 2% de amostras resistentes no mesmo grupo (AMP e AMC). Nos aminoglicosídeos, isso não se verifica, pois nas amostras avaliadas não há resistências simultâneas a antibióticos deste grupo.

Os níveis de resistência a antimicrobianos dentro do mesmo grupo, é neste trabalho bastante inferior ao encontrado por Bhargava e colaboradores em 2012, em que a incidência de resistência a ampicilina, oxacilina e penicilina foi muito semelhante (Bhargava and Zhang, 2012).

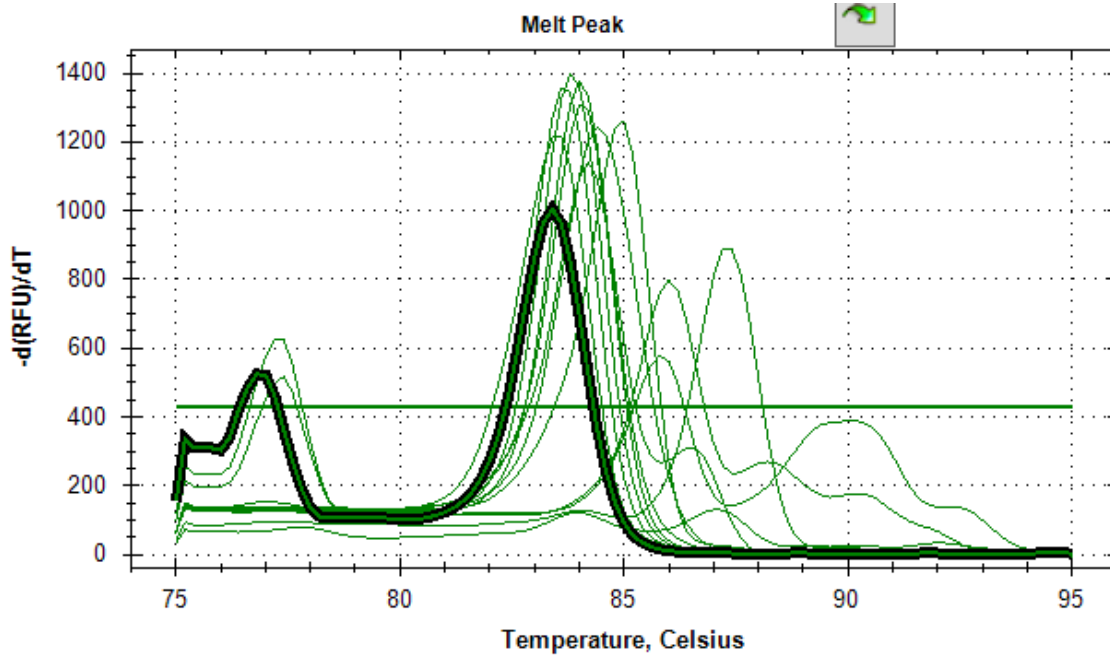


#### 4.2. Detecção do gene *mecA*, *mecC* e *pvl*

A deteção rápida e precisa da resistência à meticilina em *Staphylococcus* é um importante dado para tratar infeções graves. A resistência à meticilina é mediada pela proteína *PBP 2a* (proteína que se liga à penicilina), codificada pelo gene *mecA*, que é parte integrante de um elemento genético móvel designado *SCCmec*, *Staphylococcal cassette chromosome mec*, (Laurent et al., 2012). A presença do gene *mecA*, que codifica para *PBP2a*, correlaciona-se com a resistência à oxacilina também em CoNS (Perazzi et al., 2006).

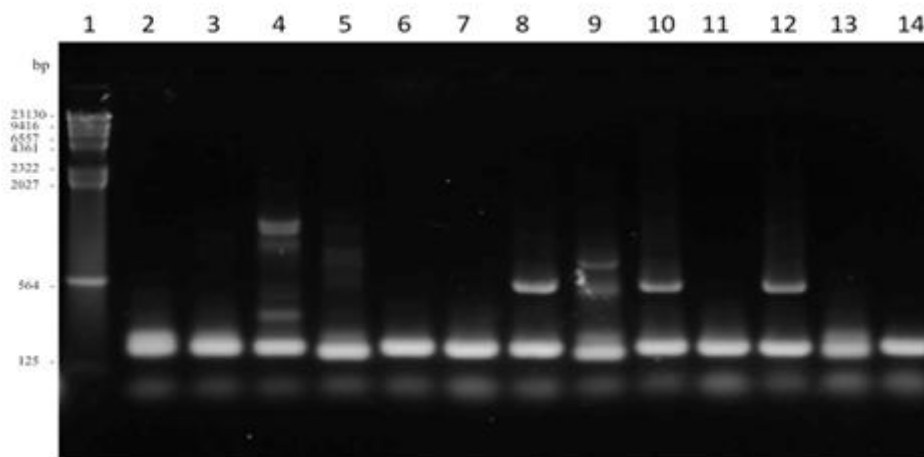
Este gene é muitas vezes expresso de forma heterogênea, e assim sendo, os métodos de testes de sensibilidade convencionais podem falhar na deteção da resistência à meticilina. Atualmente a deteção do gene *mecA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é considerado ser o principal teste para a classificação de estirpes como resistentes à meticilina apesar de atualmente existir pelo menos um gene homólogo (*mecC*) que confere resistência à meticilina em *Staphylococcus* (Ghoshal et al., 2004).

Pelo método das diluições sucessivas foi possível detetar resistência à oxacilina em 51% das amostras testadas. Após isolamento do DNA de todos os isolados resistentes à oxacilina, foi realizada uma amplificação por RT-PCR, para deteção do gene *mecA*. Estas estirpes foram estudadas por PCR para a deteção do gene *mecA* (figura 1). Todas as amostras apresentam amplificação de um fragmento de 193pb, que corresponde a um controlo interno usado na reação, utilizando-se os primers *V3F* e *V3R* apresentados na tabela 4. A curva de *melting* dos produtos de PCR obtidos permitiu distinguir claramente 2 produtos com temperaturas de fusão distintas (77-78°C e 83-84°C) sendo que a banda correspondente ao gene *mecA* é o produto de amplificação com uma temperatura de fusão de 77-78°C.

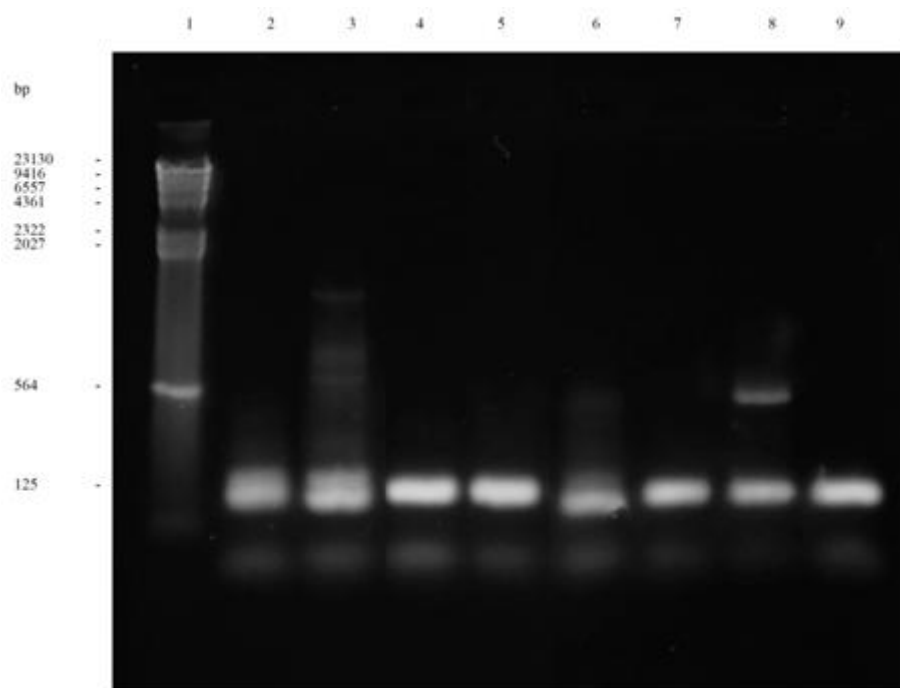


**Figura 3** – Curva de fusão de controlo positivo.

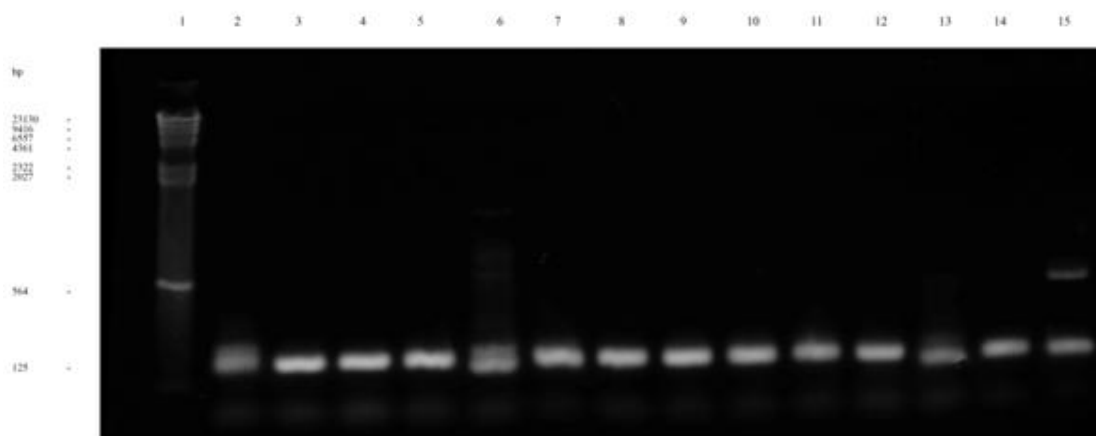
A figura ilustra várias curvas de fusão das amostras testadas. A linha mais carregada corresponde ao controlo positivo usado no PCR, (amostra B912). O primeiro pico é relativo à presença do gene *mecA* (77-78°C) e o segundo pico (83-84°C) ao controlo interno V3.



**Figura 4** – Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecA*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R. (1 – I-*Hind*II; 2-Branco; 3-B475; 4-B502; 5-B422; 6-B439; 7-B491; 8-B484; 9-B432; 10-B469; 11-B501; 12-B912; 13-B920; 14-*S. aureus* NCTC 6571)



**Figura 5** - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecA*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R. (1 – *Hind*III; 2-Branco; 3-B139; 4-B163; 5-B153; 6-B206; 7-B124; 8- B912; 9-*S. aureus* NCTC 6571)



**Figura 6** - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecA*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R. (1 – *Hind*III; 2-Branco; 3-B156; 4-B176; 5-B171; 6-B146; 7-B160; 8- B201; 9-B162; 10-B918; 11-B161; 12-B165; 13-B169; 14- *S. aureus* NCTC 6571; 15-B912)

A análise dos dados relativos aos antibiogramas indicou que 51% das estirpes eram resistentes à oxacilina sendo por consequência as estirpes classificadas como resistentes à meticilina. O produto de PCR com o tamanho esperado de 533pb resultante da amplificação do gene *mecA* foi apenas detetado em 8% dos 51% dos isolados resistentes à oxacilina. O seu homólogo *mecC* foi também alvo de deteção por RT-PCR. No entanto, não foi possível detetar o produto de PCR esperado em nenhuma estirpe. Este resultado é provisório dada a não disponibilidade de um controlo positivo para o gene *mecC*. Ghoshal et al., 2004, em 90 amostras estudadas detetaram resistência à oxacilina em 80% e presença do gene *mecA* em 84% respetivamente. Em 2012, Bhargava and Zhang, num estudo de multiresistência de *Staphylococcus coagulase* negativos encontraram 100% de estirpes resistentes à oxacilina e 67,8% de presença do gene *mecA*. Estes valores comparados com os deste estudo são bastante superiores, uma vez que a incidência de presença do gene *mecA* nas estirpes resistentes à oxacilina foi muito baixa.

Num estudo desenvolvido por Olayinka e colaboradores, o fenótipo encontrado nos MRSA isolados não foi a clássica resistência mediada pela presença do gene *mecA*, mas sim sugerido que este fenótipo tenha sido originado por uma hiperprodução de  $\beta$ -lactamase, o que é uma explicação possível para os resultados obtidos, embora careça de confirmação (Olayinka et al., 2009).

Um homólogo do gene *mecA* (*mecALGA251*) foi relatado recentemente. Os genes *mecALGA251* têm apenas 70% de homologia de nucleotídeos com o *mecA*, e são encontrados no elemento genético do *Staphylococcus* designado SCCmec XI. Isolados com *mecALGA251* provaram ser fenotipicamente resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, mas não eram identificados como MRSA com PCRs convencionais para *mecA*. A deteção genotípica de *mecA* é amplamente utilizada como referência padrão para identificação de MRSA, se utilizado como um teste primário ou confirmação. Isolados *mecA* negativos quando testado por PCR mas fenotipicamente resistentes são muitas vezes identificados como *S. aureus* resistentes à oxacilina, ou moderadamente resistentes (Stegger et al., 2012).

Num estudo realizado na Dinamarca, foram encontrados 12 isolados *mecALGA251* positivos num total de 203 isolados, fornecendo evidências de

que o gene *mecALGA251* é potencialmente significativo para a ocorrência de MRSA na Dinamarca (Stegger et al., 2012).

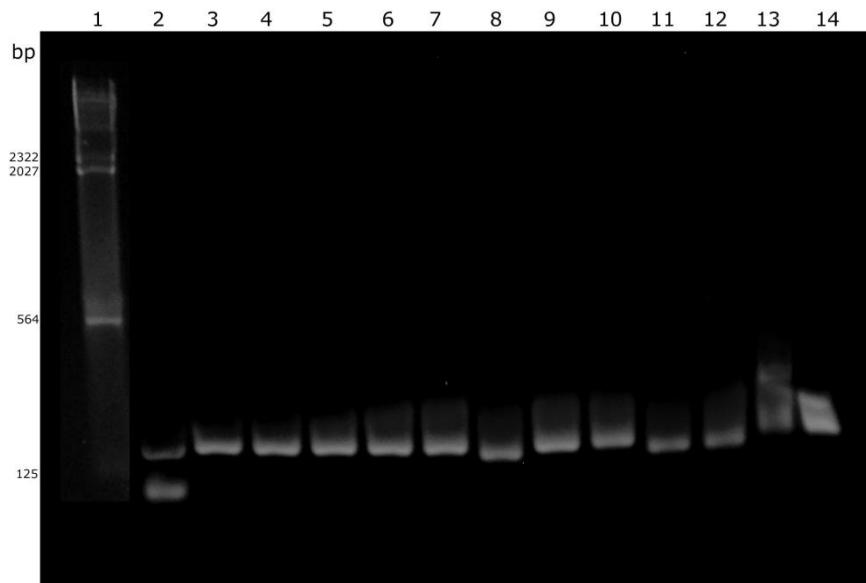
No entanto, neste estudo, nenhuma das estirpes *mecA* negativas revelou possuir o gene *mecC*.

Desde 1981, que um novo tipo de MRSA, denominada MRSA adquirida na comunidade ou CA-MRSA, emergiu. Embora, geneticamente o CA-MRSA consista em diferentes clones específicos, muitas das estirpes de CA-MRSA possuem o gene Panton-Valentine leukocidin (LPV) (*lukPVSF*). Segundo Nakagawa e colaboradores, foi estabelecido um diagnóstico de DNA rápido e específico para CA – MRSA *pvl* positivo (Nakagawa et al., 2005).

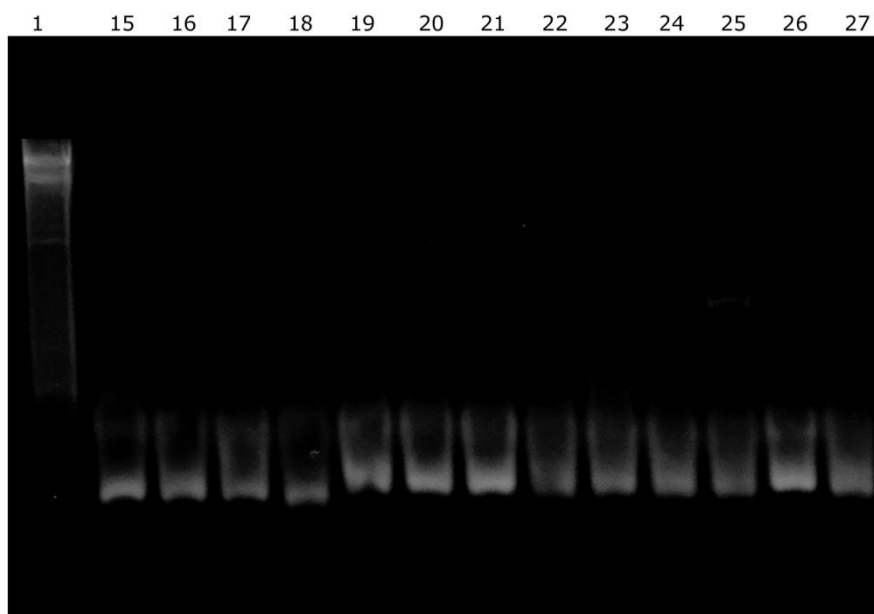
No estudo conduzido por Vandenesch e colaboradores em 2013, verificou-se que a sequência genômica dos isolados CA-MRSA indica não só a presença de SCC*mec* IVa, mas também do gene *pvl* (Vandenesch et al., 2003). O gene *pvl* é transportado num bacteriófago e está presente apenas numa pequena percentagem de isolados de *S. aureus*, onde está associado com infeções da pele e pneumonia necrotizante grave (Vandenesch et al., 2003). A Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) é uma citotoxina que causa a destruição de leucócitos e necrose dos tecidos. É produzida por menos de 5% das estirpes de *Staphylococcus aureus*. A importância do gene *pvl* como um fator de virulência potencial, levou Lina et al., 1999, a investigar a frequência de *S. aureus* possuidoras de *pvl* em diversas síndromes clínicas, incluindo não só infeções primárias espontâneas e infeções secundárias da pele após a lesão, mas também várias infeções profundas, tais como pneumonia, endocardite infecciosa, osteomielite, e enterocolite. Neste estudo, o gene *pvl* foi encontrado em 93% das estirpes associadas à furunculose e em 85% dos associados a pneumonia hemorrágica necrótica grave (todas adquirida na comunidade). Foi também detetado em 55% das estirpes de celulite, 50% das estirpes de abscessos cutâneos, 23% das estirpes de osteomielite, e 13% das estirpes de dedo-celulose-infeção (Lina et al., 1999).

O método utilizado foi descrito pela primeira vez por Stegger e colaboradores em 2012, e consiste num método de PCR multiplex, o qual pode ser utilizado

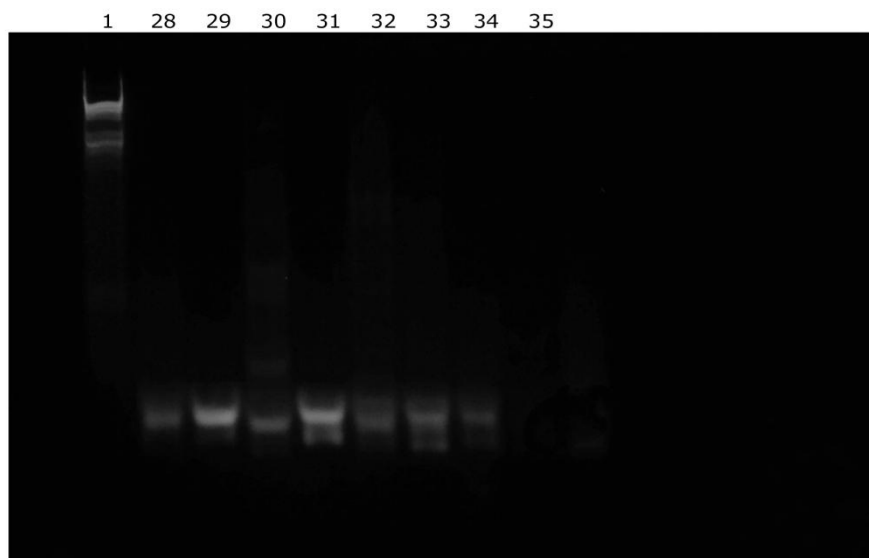
para a confirmação da resistência à meticilina por amplificação tanto do gene *mecA* e *mecC*, identificação de *S. aureus* por amplificação do gene *spa* e detecção do gene que codifica para a Leucocidina de Panton Valentin (*PVL* ou *LukF-PV*), e para a sua detecção juntamente (Stegger et al., 2012).



**Figura 7** - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecC* e *pvl*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R, produto de 85pb refere-se ao gene *pvl*. (1-HindII; 2-posPVLNCTC 6571; 3-B912; 4-B491; 5-B484; 6-B501; 7-B469; 8-B422; 9-B439; 10-B475; 11-B432; 12-B420; 13- B5902; 14-B117)



**Figura 8** - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecC* e *pvl*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R, produto de 85pb refere-se ao gene *pvl*. (1-HindII; 15-B148; 16-B155; 17-B208; 18-B206; 19-B124; 20-B153; 21-B156; 22-B176; 23-B171; 24-B160; 25-B201; 26- B162; 27-B118)



**Figura 9** - Análise electroforética em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *mecC* e *pvl*. Produto de 193pb refere-se a controlo interno através da utilização dos primers V3F e V3R, produto de 85pb refere-se ao gene *pvl*. (1 HindII; 28 – B161; 29-B139; 30-B165; 31-B144; 32-B163; 33-B169; 34-B143; 35-Branco)

O produto de PCR correspondente à amplificação do gene *pvl* com 85pb é apenas detetado no controlo positivo (B912), tendo sido usada uma estirpe de referência *S. aureus* NCTC 6571 *pvl* positiva como controlo. Nenhuma das estirpes testadas mostrou possuir este fator de virulência.

Os resultados fornecem evidências de que os aterros sanitários podem servir como um meio para a circulação de estirpes MSSA e CoNS entre o meio ambiente e os trabalhadores, à semelhança de resultados encontrados por Goldstein e colaboradores, num estudo desenvolvido em estações de tratamentos de água em 2012 (Goldstein et al., 2012).

Embora os MR CoNS sejam considerados de baixa patogenicidade, a elevada prevalência de CoNS resistentes à oxacilina, é de considerar, pois podem atuar como um reservatório de genes de resistência que podem disseminar para *S.aureus* (Hope et al., 2008). Para além disso, a descoberta de que CoNS podem produzir enterotoxinas, requer que a importância desses microrganismos seja reconsiderada, e a sua importância para a saúde pública tornou-se uma preocupação mundial (Fontes et al., 2013).

Estes resultados levantam potenciais problemas de saúde pública para os trabalhadores dos aterros sanitários. Estes trabalhadores podem estar expostos através de várias vias de exposição, incluindo dérmicos e de inalação.

As implicações clínicas de infeções provocadas por *Staphylococcus* spp podem ser várias. O *S. aureus* pode provocar infeções tais como bacteriemia, pneumonia, endocardite aguda, meningite, abscessos musculares, osteomielite, intoxicações alimentares, infeções de corrente sanguínea, artrite, osteomielite, erisipela, celulite, fasciite necrotisante, piomiosite. Já os *Staphylococcus* coagulase negativos podem provocar infeções da corrente sanguínea, pneumonia, artrite, osteomielite, erisipela, celulite, fasciite necrotisante, piomiosite, endocardite (Forbis and Sahm, 1998).

Os principais problemas de saúde ocupacional encontrados em trabalhadores envolvidos em estações de tratamentos de resíduos são doenças pulmonares, síndrome tóxica poeira orgânica (STPO), problemas gastrointestinais e problemas de irritação da pele, olhos e mucosas. As grandes infeções (como



por exemplo, as pneumonias e aspergilose) são raramente relatadas e parecem manter-se como casos individuais. Aqueles que correm maior risco de desenvolver complicações de saúde se expostos a grandes concentrações de esporos incluem os que já sofrem de asma, pessoas imunodeprimidas, ou pessoas que tomam doses altas de corticosteroides (Brun, E. et al, 2007).

As medidas para impedir a disseminação de organismos resistentes e a contaminação dos trabalhadores, incluem a melhoria da organização do trabalho, a limpeza regular dos locais de trabalho, o uso de equipamentos de proteção individual concebidos para a segurança, manuseamento adequado de resíduos e a lavagem completa das mãos. Outras recomendações coincidem com a esfera da saúde pública e defender o rigoroso controlo da utilização dos antibióticos.

#### **4.3. Estudo do perfil de resistência de bactérias resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colónias obtidas de amostras de ar**

A rápida emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos, tais como imipenemo e meropenemo, representa uma ameaça considerável para o cuidado clínico do paciente e para a saúde pública. Estirpes produtoras de carbapenemases são caracterizadas pela sua resistência a praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas e carbapenemos, bem como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cotrimoxazol (Cohen Stuart et al., 2010).

Têm a tendência de se espalhar facilmente entre humanos, alimentos contaminados e água, e adquirir material genético através de transferência horizontal de genes, mediada principalmente por plasmídeos e transposões.

*Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos foram relatadas em todo o mundo, como consequência, em grande parte de aquisição de genes produtores de carbapenemases. A primeira produtora de carbapenemase em *Enterobacteriaceae* (*NmcA*) foi identificada em 1993. Desde então, uma grande variedade de carbapenemases tem sido identificada em *Enterobacteriaceae*, pertencentes 3 classes moleculares de  $\beta$ -lactamases: classe A de Ambler, B, e D (Nordmann et al., 2011).

A detecção de produtores de carbapenemases em infeções clínicas é baseada em primeiro lugar em resultados de testes de suscetibilidade obtidos por difusão do disco ou por sistemas automatizados. Os *breakpoints* para os Carbapenemos do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) foram reduzidos substancialmente em 2010, para uma melhor detecção de isolados resistentes a Carbapenemos e produtores de carbapenemase (Ertapenemo  $R \geq 1$ , Imipenemo  $R \geq 4$  e Meropenemo  $R \geq 8$ ) (Nordmann et al., 2011).

As *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases são diferentes das outras bactérias multirresistentes, pois são suscetíveis a poucas drogas antibacterianas (Nordmann et al., 2011).

As *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, têm muitas vezes MICs inferiores aos pontos de interrupção dos carbapenemos. No entanto, os valores definidos como ECOFF pelo EUCAST podem ser utilizados para detetar produtores de carbapenemases. O meropenemo é o carbapenemo que oferece o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade em termos de deteção de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase (C. et al., 2012).

As carbapenemases são  $\beta$ -lactamases que hidrolisam penicilinas, na maioria dos casos, as cefalosporinas, e vários graus de carbapenemos e monobactâmicos (Giske et al., 2013). São portanto uma fonte de preocupação, porque conferem resistência a praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos. Estirpes produtoras de carbapenemases possuem frequentemente mecanismos de resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos e as infeções provocadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases estão associados a altas taxas de mortalidade (C. et al., 2012; Giske et al., 2013). A diminuição da suscetibilidade aos carbapenémicos em enterobactérias podem, no entanto, também ser provocada por  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL) ou enzimas *AmpC* combinadas com a diminuição da permeabilidade devido à alteração ou baixa regulação de porinas (Giske et al., 2013). A produção e disseminação de carbapenemases é produzida por plasmídeos, razão pela qual o risco de disseminação entre espécies é muito alto (OMS, 2011).

No presente trabalho, culturas mistas ricas em *Enterobacteriaceae* identificadas em amostras de aterros foram sujeitas a um *screening* em meio agar de MacConkey com meropenemo (2mg/L). Apesar de usado para a deteção e isolamento de *Enterobacteriaceae* e patogénicos entéricos em vários tipos de matrizes, este meio de cultura possui um nível de seletividade que não permite garantir apenas o crescimento de *Enterobacteriaceae*. Assim, os resultados a seguir apresentados, assumem o carácter presuntivo dos isolados, carecendo de testes confirmatórios adicionais. O perfil fenotípico de resistência a agentes antimicrobianos foi realizado apenas nas estirpes que apresentaram desenvolvimento no meio em que o *screening* foi realizado.

O "*screening*" incidiu sobre suspensões de colónias (preservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) de 133 amostras onde a identificação de *Enterobacteriaceae* foi evidenciada.

As culturas mistas foram inicialmente incubadas em BHI com 2mg/L de meropenemo. As culturas que apresentaram crescimento ao fim de 24h a 37°C foram inoculadas em placas de MacConkey com 2mg/L de meropenemo. Das amostras testadas 46% não mostraram qualquer crescimento em BHI na presença do antibiótico.

Destas amostras, apenas 38% tiveram crescimento em MacConkey com 2mg/L de meropenemo. Os restantes 63% não cresceram em MacConkey com 2mg/L meropenemo.

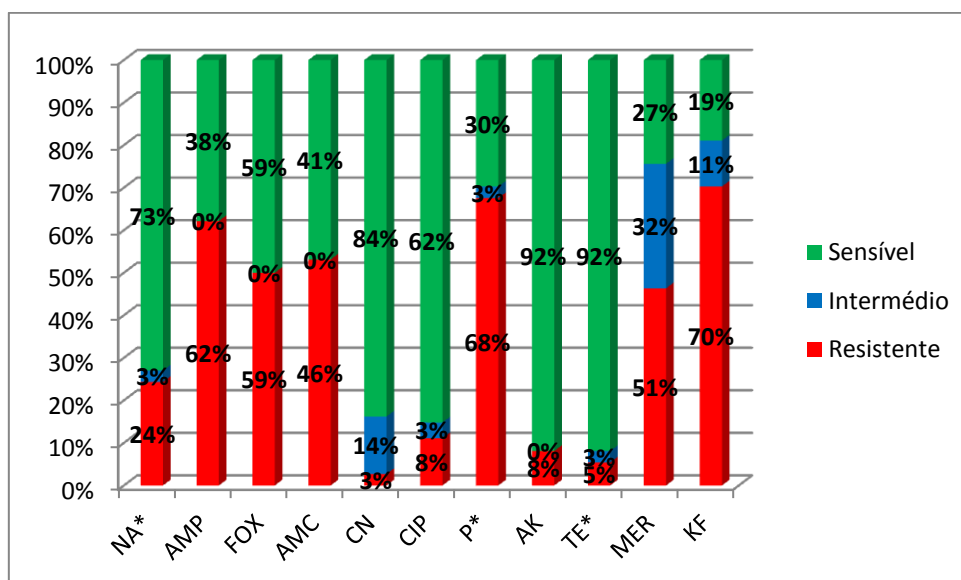
No total foi possível isolar 37 estirpes com evidente crescimento em meio MacConkey com meropenemo a partir de 27 amostras de ar.

Destas 37 amostras foi estudado o perfil de resistência a diferentes antibióticos, nomeadamente, penicilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, tetraciclina, amicacina, cefalotina, cefoxitina, neomicina, ácido nalidíxico, gentamicina, ciprofloxacina, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, e eritromicina. A resistência ao meropenemo foi também avaliada pelo método de difusão em agar.

**Tabela 9** - Prevalência da resistência antimicrobiana comum nas estirpes Gram (-) isoladas.

		Nº estirpes Gram (-) isoladas resistentes aos antimicrobianos
Penicilinas	Ampicilina	23 (62%)
	Amoxicilina + ácido clavulânico	17 (46%)
	Penicilina	25 (68%)
Glicopeptídeos	Vancomicina*	3 (8%)
	Teicoplanina*	13 (35%)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	3 (8%)
	Ácido Nalidíxico	9 (24%)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	1 (3%)
	Amicacina	2 (8%)
Cefalosporinas	Cefalotina	26 (70%)
	Cefoxitina	22(59%)
Carbapenemos	Meropenemo	19(51%)
	Tetraciclina*	1(3%)
Macrolídeos	Eritromicina*	0 (0%)
	Rifampicina*	1(8%)
	Neomicina*	5(14%)

A incidência das estirpes Gram (-) resistentes é apresentada na tabela 9. Os antibióticos apresentados com \* não apresentam valores de *breakpoint* para *Enterobacteriaceae*, contudo os dados apresentados são de estirpes que não apresentaram qualquer halo de inibição, sendo portanto consideradas resistentes.



**Figura 10** - Percentagem de estirpes resistentes a cada antibiótico. (Os valores de referência utilizados para a caracterização da resistência dão da EUCAST, à exceção dos antibióticos marcados com \* que são recomendações CLSI. (NA (Ácido Nalidíxico), AMP (Ampicilina), FOX (Cefoxitina), AMC (Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CN (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacina), P (Penicilina), AK (Amicacina), TE (Tetraciclina), MER (Meropenemo) e Cefalotina (KF)).

Analisando o gráfico anterior, pode-se verificar que a maior incidência de estirpes resistentes é a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, cefalotina e cefoxitina (cefalosporinas), penicilina, ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico (penicilinas) todos acima dos 45%, tal como descrito por (Paterson, 2006), em que refere que as *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos. Em condições de *screening* a partir de 133 amostras de ar contendo *Enterobacteriaceae*, usando concentrações de meropenemo de 2mg/L, obteve-se 20% de amostras com crescimento. O isolamento de bactérias Gram (-) destas amostras permitiu verificar que das amostras analisadas, 51% continham estirpes Gram (-) resistentes ao meropenemo. A partir das amostras com isolados resistentes foram isoladas 37 estirpes com resistência confirmada.

Para os restantes antibióticos testados não existem valores recomendados para *Enterobacteriaceae* da EUCAST nem CLSI. A identificação dos isolados até à espécie é fundamental para uma mais correta classificação em termos de resistência.

Os antibióticos em que não há valores referenciados são teicoplanina (TEC), neomicina (N), vancomicina (VA), eritromicina (E) e rifampicina (RD). Contudo, pela inexistência de qualquer halo de inibição, é no entanto possível concluir que no mínimo das 37 estirpes testadas, 35% são resistentes ao teicoplanina (TEC), 14% à neomicina (N), 8% à vancomicina (VA) e 3% à rifampicina (RD). Relativamente à eritromicina nenhuma estirpe testada apresentou nenhum halo de inibição.

A instabilidade do meropenemo em solução foi já comprovada por vários autores.

Em virtude da instabilidade do meropenemo após preparação (em solução e em placa), a resistência de todas as estirpes foi confirmada por difusão em agar com discos de Meropenemo, por forma a evitar a ocorrência de falsos positivos. Apenas 51 % das estirpes isoladas no *screening* se confirmaram como positivas relativamente à resistência ao meropenemo. Assim, verifica-se que relativamente às amostras testadas, 12% das amostras continham bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo. Esta elevada incidência de resistência ao meropenemo pode ser preocupante, uma vez que os carbapenemos são considerados como os agentes antibacterianos preferidos no tratamento de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (Paterson, 2006; Pitout and Laupland, 2008).

Da associação de dois antibióticos e analisando a resistência simultânea a cada par de antibióticos os dados obtidos são descritos de seguida, para os antibióticos em que a incidência é significativa, sendo também estes os antibióticos com mais estirpes resistentes, que é o caso das Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenemos.

Dos 62% de estirpes resistentes à ampicilina (AMP), 59% são também resistentes à cefoxitina (FOX) e cefalotina (KF), seguida de 62% à penicilina (P), 54% à amoxicilina – ácido clavulânico (AMC), 49% ao meropenemo (MER) e por último gentamicina (CN), sendo esta de 3%. Relativamente aos restantes antibióticos, não há nenhuma estirpe que seja resistente à ampicilina (AMP) e à ciprofloxacina (CIP), amicacina (AK) e tetraciclina (TE).

Analisando as estirpes resistentes à amoxicilina – ácido clavulânico (AMC) verificamos que apresentam resistência simultânea em 59% à cefoxitina (FOX) e cefalotina (KF), 57% à penicilina (P), 54% à ampicilina (AMP), 49% ao meropenemo (MER) e 3% à gentamicina (CN). Relativamente aos restantes antibióticos, não há nenhuma estirpe que seja resistente à ciprofloxacina (CIP), amicacina (AK) e tetraciclina (TE) e ácido nalidíxico (NA).

Na associação da cefoxitina (FOX) com os restantes antibióticos, os que apresentam maior percentagem de resistentes é a cefalotina (KF) com 68%, depois penicilina (P) com 62%, seguida da amoxicilina – ácido clavulânico (AMC) e ampicilina (AMP) com 59%, depois meropenemo (MER) com 51%, ácido nalidíxico (NA) com 22%, amicacina (AK) e ciprofloxacina (CIP) com 5%, e gentamicina (CN), sendo esta de 3%.

As estirpes resistentes à cefalotina (KF) apresentam resistência em simultâneo a todos os antibióticos testados à exceção da amicacina (AK), sendo que cefoxitina (FOX) apresenta 68%, seguida da penicilina (P) com 65%, a ampicilina (AMP) e amoxicilina – ácido clavulânico (AMC) com 59%, meropenemo (MER) com 51% e ácido nalidíxico, gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina com 3%.

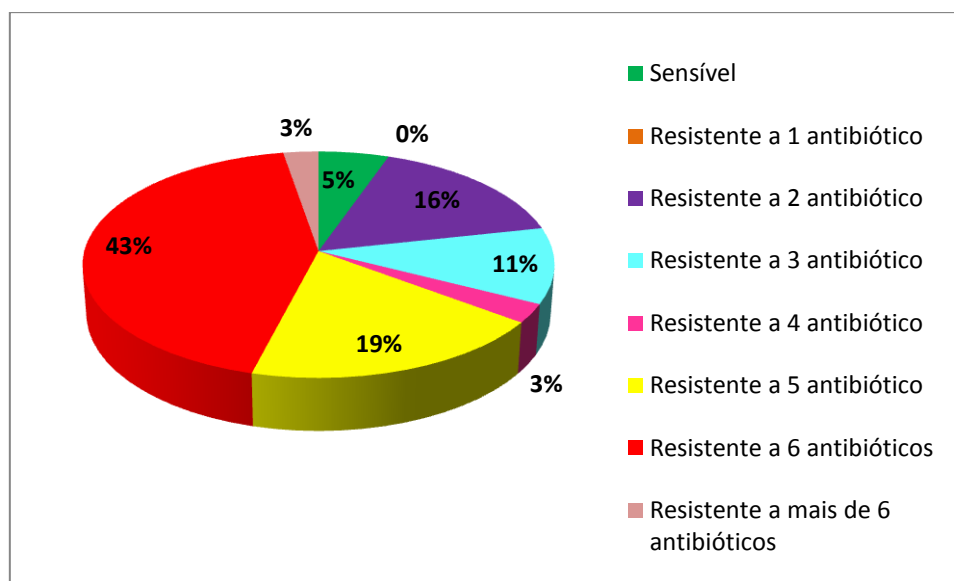
Dos 68% de estirpes resistentes à penicilina (P), 65% são também resistentes à cefalotina (KF), seguida da ampicilina (AMP) e cefoxitina (FOX) com 62%, amoxicilina – ácido clavulânico (AMC) 57%, meropenemo (MER) 49%, ciprofloxacina (CIP) 5%, e por último gentamicina (CN), sendo esta de 3%.

As estirpes resistentes ao meropenemo (MER) apresentam resistência em simultâneo a todos os antibióticos testados com exceção da amicacina (AK). A incidência de resistência é de 51% à cefoxitina (FOX) e cefalotina (KF), ampicilina, penicilina e amoxicilina – ácido clavulânico com 49% e ácido nalidíxico, gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina com 3%.

Das estirpes resistentes ao ácido nalidíxico (NA), 22% são também resistentes à cefoxitina (FOX), seguida de 8% à ciprofloxacina (CIP) e à amicacina (AK), 5% à tetraciclina (TE) e 3% ao meropenemo.



Os restantes antibióticos, gentamicina (CN), ciprofloxacina (CIP) e amicacina apresentam resistência em associação de antibióticos que não é significativa, pois a prevalência é baixa.



**Figura 11** - Perfil de resistências das estirpes testadas.

95% das amostras apresentaram resistência a pelo menos 1 antibiótico, sendo que, 16% demonstraram resistência a 2 antibióticos, seguida de 11% a 3 antibióticos, 3% a 4 antibióticos, 19% resistentes a 5 antibióticos, 43% resistente a 6 antibióticos e 3% resistente a mais de 6 antibióticos e sem resistência nenhuma apenas 5%.

Como já foi descrito anteriormente, têm sido usados na literatura diferentes critérios para classificação da resistência das estirpes bacterianas (Bhargava and Zhang, 2012; Magiorakos et al., 2012).

No entanto, em 2012 (Magiorakos et al., 2012) criaram uma terminologia internacional padronizada com o qual descrevem os perfis de resistência adquirida também para *Enterobacteriaceae* (exceto *Salmonella* e *Shigella*).

**Tabela 10** - Fenótipos de resistência a antibióticos de espécies Gram (-) isoladas do ar ambiente.

Isolados*	Fenótipo de resistência					Penicilinas + inibidores $\beta$ - lactamase (AMC)	Classificação segundo Magiorakos et al
	Penicilinas (AMP)	Carbapenemos (MER)	Fluoroquinolonas (CIP)	Cefamicinas (FOX)	Aminoglicosídeos (CN, AK)		
<b>B1033</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1034</b>	AMP	MER		FOX	AK	AMC	<b>MDR</b>
<b>B1035</b>							
<b>B1036</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1037</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1038</b>				FOX			
<b>B1167</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1039</b>			CIP				
<b>B1040</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1168</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1041</b>			CIP	FOX	CN		<b>MDR</b>
<b>B1169</b>				FOX		AMC	
<b>B1042</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1043</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1044</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1045</b>		MER	CIP	FOX			<b>MDR</b>
<b>B1046</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1047</b>				FOX			
<b>B1048</b>	AMP						
<b>B1050</b>	AMP			FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1051</b>				FOX	CN		
<b>B1052</b>							
<b>B1053</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1054</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>

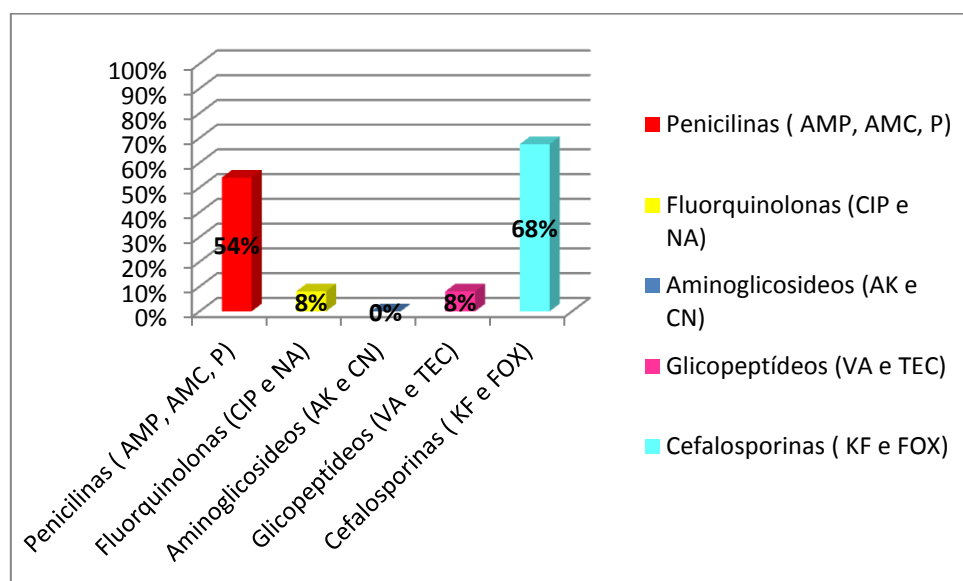
Isolados*	Fenótipo de resistência					Penicilinas + inibidores $\beta$ - lactamase (AMC)	Classificação segundo Magiorakos et al
	Penicilinas (AMP)	Carbapenemos (MER)	Fluoroquinolonas (CIP)	Cefamicinas (FOX)	Aminoglicosídeos (CN, AK)		
<b>B1171</b>				FOX			
<b>B1055</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1056</b>							
<b>B1057</b>	AMP			FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1058</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1059</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1060</b>				FOX	AK		
<b>B1061</b>	AMP			FOX			
<b>B1062</b>	AMP			FOX			
<b>B1063</b>				FOX	AK		
<b>B1065</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>
<b>B1066</b>				FOX		AMC	
<b>B1067</b>	AMP	MER		FOX		AMC	<b>MDR</b>

\* código da estirpe na coleção da UMA

Utilizando o critério de Magiorakos e colaboradores, e considerando os antibióticos testados, 22 estirpes podem ser classificadas como MDR (apresentou resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos), e nenhuma como XDR e PDR, uma vez que pode apresentar resistência para os antibióticos não testados. No entanto, e considerando a gama de antibióticos sugeridos por Magiorakos na sua classificação de resistência para estirpes de *Enterobacteriaceae*, várias outras estirpes poderiam ser consideradas potencialmente como MDR já que apenas 25% dos antibióticos foram testados em relação ao sugerido pelo autor.

De acordo com o critério de Zhang et al, 2009, para os isolados multirresistentes, em que classificam estirpe multirresistente quando resistente a 3 ou mais antibióticos, podemos afirmar que 79% das estirpes são consideradas multirresistentes.

Segundo (Pitout and Laupland, 2008), desde 1990 que a multirresistência em *Enterobacteriaceae* tem sido descrita e tem emergido na comunidade. Neste estudo, isto é evidenciado pelo facto de que 95% das estirpes são resistentes a mais do que um antibiótico. 43% demonstraram resistência a 6 dos antibióticos testados.



**Figura 12** - Perfil de resistências a famílias de antibióticos.

Relativamente a antibióticos usados dentro da mesma família, nos grupos avaliados verifica-se que, 54% demonstraram resistência às penicilinas (AMP, AMC e P), 8% demonstraram resistência às fluoroquinolonas (CIP e NA) e aos glicopeptídeos (VA e TEC) e 68% demonstraram resistência às cefalosporinas (KF e FOX). Relativamente aos aminoglicosídeos (AK e CN), não foram encontradas resistências aos antibióticos do mesmo grupo. Estes dados confirmam que a maior incidência de resistências encontradas é às cefalosporinas e penicilinas, como descrito por (Cohen Stuart et al., 2010; Paterson, 2006; Pitout and Laupland, 2008).

Para além das resistências adquiridas, a resistência intrínseca é uma característica de todas ou quase todas as espécies bacterianas, sendo específica para diferentes espécies ou géneros e delinea o espectro de atividade dos antibióticos. Deve-se a três possíveis razões, à ausência de um processo metabólico influenciável pelo antibiótico, à existência de enzimas que apresentem a capacidade de inativar o antibiótico, ou a presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana. Existem nas *Enterobacteriaceae* algumas resistências intrínsecas a alguns agentes (JR. and P., 1995; Leclercq et al., 2013)

Douwes e colaboradores, 2003, e Brooks e colaboradores em 2004, referem que uma elevada variedade de problemas de saúde, incluindo doenças infecciosas, efeitos tóxicos agudos, alergias, cancro, sintomas respiratórios e alterações na função pulmonar de trabalhadores de uma ETAR, foram relacionados com a exposição a bioaerossóis no ambiente de trabalho. O perigo potencial dos bioaerossóis depende da patogenicidade dos microrganismos, fatores ambientais, bem como das *pools* de genes de bactérias, incluindo genes de resistência a antibióticos. Os microrganismos têm diferentes mecanismos para se tornarem resistentes a um antibiótico, mas as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) são um dos mecanismos mais importantes da resistência bacteriana a  $\beta$ -lactâmicos.

Existem mais de 300 subtipos de ESBL e entre eles genes que codificam CTX, TEM, OXA ou SHV são os tipos mais comuns (Bush e Jacoby, 2010).

Segundo Paterson et al, 2006, as bactérias Gram (-) da família *Enterobacteriaceae* são causas importantes de infeções do trato urinário (ITU), infeções da corrente sanguínea, pneumonias associadas a cuidados de saúde, e várias infeções intra-abdominais. Dentro desta família, a *Escherichia coli* é uma frequente responsável de infeções do trato urinário, e as *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp são importantes causadoras de pneumonia e têm sido implicadas em infeções da corrente sanguínea e em peritonite, e outras infeções intra-abdominais. Além disso, organismos, tais como *Salmonella* produzem gastroenterite e, posteriormente, em alguns pacientes, infeção invasiva. A emergente resistência em *Enterobacteriaceae* é um problema significativo que requer atenção particular (Paterson, 2006).

Estes mesmos efeitos provocados por bactérias podem variar consoante a infeção é nosocomial ou adquirida na comunidade. As infeções provocadas por bactérias produtoras de ESBL adquiridas na comunidade, na maioria das vezes são UTIs, mas também bacteriemia e gastroenterite, enquanto as nosocomiais são infeções das vias respiratórias, intra-abdominal, e infeções da corrente sanguínea. Pesquisas desde 2000 a partir de vários países europeus (incluindo a Espanha, Itália, Grécia, Reino Unido, e Canadá) mostraram uma tendência alarmante de resistência associada a outras classes de agentes antimicrobianos entre os organismos produtores de ESBL isoladas da comunidade (Pitout and Laupland, 2008).

O nível de expressão e as propriedades de uma enzima, e a associação comum com outros mecanismos de resistência (outros  $\beta$ -lactamases, o efluxo, permeabilidade alterada), resulta numa ampla gama de fenótipos de resistência observada entre os isolados produtores de carbapenemase. A diminuição da suscetibilidade aos carbapenémicos em enterobactérias pode, no entanto, também ser provocada por uma ESBL ou enzimas *AmpC*, combinadas com a diminuição da permeabilidade devido à alteração ou baixa regulação de porinas (C. et al., 2012).

Surpreendentemente, estamos agora perante uma situação para isolados de enterobactérias produtoras de ESBL que espelha a epidemiologia da resistência à metilina em *Staphylococcus aureus*. Em ambos os casos, os mecanismos de resistência foram relatados pela primeira vez em patogénios

hospitalares, mas esta tem sido seguido pelo aparecimento de diferentes estirpes na comunidade. A disseminação de enzimas CTX-M já ocorreu em patogénios típicos adquiridos na comunidade, tais como *Salmonella* e *Shigella* spp., que acrescenta um grau de dificuldade para controlar a sua propagação, pois a maioria destas espécies são estão presentes entre seres humanos e animais (Pitout et al., 2005).

Relativamente às estirpes isoladas seria recomendável fazerem-se testes para confirmação das carbapenemases produzidas pelas estirpes em estudo. Nomeadamente poderiam ser realizados testes fenotípicos nomeadamente com EDTA e ácido dipicolínico para diferenciar as carbapenemases (metalo- $\beta$ -lactamases, carbapenemases classe A, carbapenemases classe D e ainda ESBL e *AmpC*, ou testes genotípicos baseados em técnicas de PCR, com primers direcionados para os genes que são conhecidos e que promovem a resistência aos carbapenemos (C. et al., 2012; Cohen Stuart et al., 2010).

A identificação das estirpes é ainda fundamental para verificar a eventual presença de estirpes produtoras de ESBLs entre as estirpes isoladas.

## 5. Conclusões

Sendo que, em muitas atividades profissionais a identificação de potenciais perigos biológicos não são, normalmente, tidos em consideração em situações de avaliação de risco, considera-se relevante avaliar a resistência a antimicrobianos de amostras de ar, em atividades em que o risco não é evidente, em particular de trabalhadores de estações de recolha e triagem de resíduos.

Para tal, avaliou-se o perfil de resistência de amostras isoladas do ar ambiente de aterros sanitários, tendo sido feita a caracterização da resistência antimicrobiana das estirpes de *Staphylococcus* spp e a deteção do gene *mecA* e do gene de virulência *pvl* nestas mesmas estirpes por PCR, bem como, o estudo do perfil de resistência de bactérias Gram (-) resistentes ao meropenemo a partir de suspensões de colónias obtidas de amostras de ar.

Neste trabalho pode verificar-se que das 49 estirpes de *Staphylococcus* spp testadas, 25 demonstraram ser resistentes à oxacilina com MICs que variaram entre 0,5mg/L a 4mg/L, sendo que 12 possuía um MIC superior a 2mg/L. A resistência a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mostrou ser sensivelmente mais baixa que o reportado noutros estudos.

A análise dos dados relativos ao *Staphylococcus* spp indicou que 51% das estirpes são classificadas como resistentes à meticilina. No entanto, na pesquisa do gene *mecA* por RT-PCR apenas foi detetado o gene em 8% dos isolados resistentes à oxacilina. Nenhuma das estirpes isoladas e estudadas revelou ser produtora da citotoxina leucocidina Panton-Valentine, uma vez que o respetivo gene *pvl* não foi detetado por RT-PCR.

Das 49 estirpes testadas, 32 foram resistentes a pelo menos um antibiótico  $\beta$ -lactâmico (65,3%), 25 foram resistentes apenas a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (51%), e 8 amostras foram resistentes a  $\beta$ -lactâmicos e qualquer outro antimicrobiano (16,3%). De todas as estirpes testadas, apenas três apresentaram resistência a pelo menos três antibióticos, sendo que destas apenas uma estirpe apresentou resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos considerando-se como tal multirresistente.



Relativamente às bactérias Gram (-) em amostras de ar ricas em *Enterobacteriaceae*, das 37 estirpes estudadas, a maior incidência de estirpes resistentes é a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, Cefalotina e Cefoxitina (cefalosporinas), Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina-ácido clavulânico (penicilinas) todos acima dos 45%.

A resistência ao meropenemo foi confirmada em 51% das estirpes isoladas no processo de *screening*, ao que corresponde a uma percentagem de amostras com estirpes resistentes ao meropenemo de 12%. Nas restantes, 27% das estirpes foram sensíveis e 32% com resistência intermédia ao meropenemo.

Considerando-se multirresistência, estirpes resistentes a 3 ou mais antibióticos, podemos dizer que temos 79% de estirpes multirresistentes.

Considerando a resistência a antibióticos da mesma classe, 68% de estirpes são resistentes às cefalosporinas (KF e FOX), seguida das penicilinas com 54% (AMP, AMC e P), dados estes confirmados por outros historiadores.

Considerando os níveis de exposição a agentes biológicos muito superiores aos de outras atividades profissionais, para além da exposição, existe um outro risco adicional que é o facto de haver nestes agentes biológicos uma incidência considerável de agentes biológicos com resistências a antimicrobianos, consideradas problemáticas nos dias de hoje. Não só os trabalhadores dos aterros sanitários estão expostos a estes agentes, como também podem ser veículos de transmissão destas estirpes para o exterior. Por outro lado, sendo estes operadores que realizam trabalho físico com algum risco de provocar danos físicos (cortes ou perfurações por ex.) o contacto ou exposição a estirpes com estas características pode de facto ser problemático. As exposições aos bioaerossóis no ambiente de trabalho estão associados a uma ampla gama de efeitos para a saúde com impacto importante na saúde pública, incluindo doenças infecciosas, efeitos tóxicos agudos, alergias e cancro.

O controlo desta exposição é difícil nos postos de trabalho em que a exposição é não intencional e a prevenção da exposição e as medidas de proteção podem ser inapropriadas.

Não foram estabelecidas relações dose-resposta para a maioria dos agentes biológicos e o conhecimento sobre os valores limite de exposição (VLE) são escassos.

Estas questões emergentes estabelecem os princípios para a gestão dos riscos biológicos e atribuem aos empregadores o dever de avaliar os riscos decorrentes de agentes biológicos no local de trabalho. A avaliação de risco é seriamente dificultada pela falta de métodos quantitativos de avaliação da exposição válidos. Portanto, é necessária mais investigação para estabelecer melhores ferramentas de avaliação da exposição e validar métodos recentemente desenvolvidos.

Embora não seja possível eliminar completamente os riscos decorrentes da presença de agentes biológicos das atividades relacionadas com os resíduos, a medida de prevenção mais eficiente é a redução da produção de poeira, bioaerossóis e compostos orgânicos voláteis no local de trabalho. Algumas medidas preventivas já foram desenvolvidas, incluindo a substituição de triagem manual por pré-triagem mecânica, a instalação de cabines de triagem com ventilação adequada, aspiração localizada para as linhas de separação, veículos fechados equipados com filtros de ar, e o uso de equipamentos de proteção individual adequados (roupa de proteção, luvas adequadas, óculos e proteção respiratória). Planos de higiene, limpeza regular, e medidas de descontaminação também podem contribuir para uma redução considerável da exposição. Deve-se ainda promover a restrição à exposição a estes agentes a um número mínimo de trabalhadores, aumentar a rotatividade, e formar e informar os mesmos dos riscos a que estão sujeitos. Ainda importante é também uma vigilância adequada da saúde dos trabalhadores.

Como os trabalhadores infetados por sua vez podem disseminar o agente para a comunidade, as considerações da OSH devem ser urgentemente integradas em planos de pandemia de saúde pública. De um modo mais geral, a cooperação entre várias autoridades, incluindo saúde pública, saúde ocupacional, saúde animal, segurança alimentar, e proteção ambiental, é de extrema importância. Vários fatores de risco são conhecidos por aumentar as hipóteses de surtos, e embora seja difícil de prever, o acompanhamento

sistemático desses fatores é essencial para uma previsão eficaz, vigilância, prevenção e controle de futuras epidemias e pandemias.

A crescente tendência que se observa do aparecimento de microrganismos multirresistentes no ambiente e na comunidade em geral, em conjunto com o facto dos trabalhadores de aterros estarem sujeitos à exposição a níveis elevados de agentes biológicos, torna naturalmente estes trabalhadores alvos mais frequentes de uma potencial contaminação com organismos patogénicos ou oportunistas multirresistentes. Não havendo, no entanto, estudos epidemiológicos que sustentem de forma sólida uma relação causal da exposição a estes agentes em atividades profissionais de elevada exposição a agentes biológicos e o desenvolvimento de infeções por agentes oportunistas ou patogénicos multirresistentes presentes no ambiente de trabalho, estudos como o apresentado podem contribuir para um melhor conhecimento desta realidade, e sensibilizar os diversos operadores do sector para um risco normalmente não tido em suficiente consideração.

## 6. Bibliografia

- Alekshun, M. N., and S. B. Levy, 2007, Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance: *Cell*, v. 128, p. 1037-1050.
- Alonso, A., P. Sanchez, and J. L. Martinez, 2001, Environmental selection of antibiotic resistance genes: *Environmental Microbiology*, v. 3, p. 1-9.
- Alvarado-Esquivel, C., O. Liesenfeld, J. A. Marquez-Conde, A. Cisneros-Camacho, S. Estrada-Martinez, S. A. Martinez-Garcia, A. Gonzalez-Herrera, and N. Garcia-Corral, 2008, Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in waste pickers and waste workers in Durango, Mexico: *Zoonoses and Public Health*, v. 55, p. 306-312.
- Aminov, R. I., 2009, The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature: *Environmental Microbiology*, v. 11, p. 2970-2988.
- Aminov, R. I., and R. I. Mackie, 2007, Evolution and ecology of antibiotic resistance genes: *Fems Microbiology Letters*, v. 271, p. 147-161.
- Auerbach, E. A., E. E. Seyfried, and K. D. McMahon, 2007, Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants: *Water Research*, v. 41, p. 1143-1151.
- Beggs, C. B., K. G. Kerr, C. J. Noakes, E. A. Hathway, and P. A. Sleight, 2008, The ventilation of multiple-bed hospital wards: Review and analysis: *American Journal of Infection Control*, v. 36, p. 250-259.
- Bhargava, K., and Y. Zhang, 2012, Multidrug-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in food animals: *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, p. 1027-1036.
- Bianca, Q., S. Carlos, H. Marco, and C. Juacyara, 2012, Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – Revisão, *Revista de Ciência e Tecnologia*.
- Brooks, J. P., S. L. Maxwell, C. Rensing, C. P. Gerba, and I. L. Pepper, 2007, Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids: *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, p. 616-622.
- Brun, E. et al, 2007, Expert forecast on Emerging Biological Risks related to Occupational Safety and Health, European Agency for Safety and Health at Work.

- Cabello, F. C., 2006, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment: *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 1137-1144.
- Canal, N., 2010, Caracterização de Resistência a Antimicrobianos e Diversidade Genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de Água a Lagoa dos Patos.
- Caplin, J. L., G. W. Hanlon, and H. D. Taylor, 2008, Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England: *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 885-892.
- Chan, M., 2011, World Health Day – 7 April 2011 Antimicrobial resistance: no action today, no cure tomorrow. Acedido em 05-03-2013. Publicado em: <http://www.who.int/world-health-day/2011/en/>.
- Cockerill, F. R., M. A. Wikler, J. Alder, M. N. Dudley, G. M. Eliopoulos, and M. J. Ferraro, 2012, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria. That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.
- Cohen Stuart, J., M. A. Leverstein-Van Hall, and M. Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant, 2010, Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae: *International journal of antimicrobial agents*, v. 36, p. 205-10.
- Corrao, C. R., A. Luzi, and G. Marini, 2003, Accidents among ambulance employees: epidemiologic features: *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia*, v. 25 Suppl, p. 196-7.
- Corrao, C. R. N., A. Mazzotta, G. La Torre, and M. De Giusti, 2012, Biological Risk and Occupational Health: *Industrial Health*, v. 50, p. 326-337.
- Crook, B., 2007, Difficulty of assessing biological risks in the workplace. Acedido a 21-03-2014. Publicado em: <https://osha.europa.eu/en/seminars/occupational-risks-from-biological-agents-facing-up-the-challenges/speech-venues/speeches/difficulty-of-assessing-biological-risks-in-the-workplace>.
- Dancer, S. J., 2008, Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning: *Lancet Infectious Diseases*, v. 8, p. 101-113.
- Dancer, S. J., M. Coyne, C. Robertson, A. Thomson, A. Guleri, and S. Alcock, 2006, Antibiotic use is associated with resistance of environmental organisms in a teaching hospital: *Journal of Hospital Infection*, v. 62, p. 200-206.

Diretiva do Conselho nº 90/219/CEE de 23/04/1990 - Documento nº 273 - Legislação Comunitária. Publicado em 08-05-1990.

Diretiva 90/679/CEE do Conselho, de 26 de Novembro de 1990 (sétima Diretiva especial na aceção do nº 1 do artigo 16º da Diretiva 89/391/CEE).

Diretiva 93/88/CEE do Conselho de 12 de Outubro de 1993 que altera a Diretiva 90/679/CEE (sétima Diretiva especial na aceção do nº 1 do artigo 16º da Diretiva 89/391/CEE).

Diretiva 95/30/CE da Comissão, de 30 de Junho de 1995, que adapta ao progresso técnico a Diretiva 90/679/CEE do Conselho, (sétima Diretiva especial na aceção do nº 1 do artigo 16º da Diretiva 89/391/CEE).

Diretiva 98/81/CE do Conselho de 26 de Outubro de 1998 que altera a Diretiva 90/219/CEE.

Diretiva 2000/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 18 de Setembro de 2000 (Sétima diretiva especial nos termos do nº. 1 do artigo 16º da Diretiva 89/391/CEE)

Douwes, J., P. Thorne, N. Pearce, and D. Heederik, 2003, Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects: *Annals of Occupational Hygiene*, v. 47, p. 187-200.

Driscoll, T., J. Takala, K. Steenland, C. Corvalan, and M. Fingerhut, 2005, Review of estimates of the global burden of injury and illness due to occupational exposures: *American Journal of Industrial Medicine*, v. 48, p. 491-502.

Drudge, C. N., S. Krajden, R. C. Summerbell, and J. A. Scott, 2012, Detection of antibiotic resistance genes associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and coagulase-negative staphylococci in hospital air filter dust by PCR: *Aerobiologia*, v. 28, p. 285-289.

[Decreto-Lei n.º 347/93. Diário da República n.º 231, Série I-A de 1993-10-01](#) - Ministério do Emprego e da Segurança Social

[Decreto-Lei n.º 84/97. Diário da República n.º 89, Série I-A de 1997-04-16](#) - Ministério para a Qualificação e o Emprego

[Decreto-Lei n.º 2/2001. Diário da República n.º 3, Série I-A de 2001-01-04](#) - Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

EU - OSHA, E. A. f. S. a. H. t. w., 2007, Occupational risks from biological agents: Facing up the challenges. Acedido a 21-03-2014. Publicado em: <https://osha.europa.eu/en/seminars/occupational-risks-from-biological-agents-facing-up-the-challenges>.

- EUCAST, T. E. C. o. A. S. T.-. 2014, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.
- Fang, Z. G., Z. Y. Ouyang, H. Zheng, X. K. Wang, and L. F. Hu, 2007, Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China: *Microbial Ecology*, v. 54, p. 487-496.
- Ferrari, M., A. Colombi, and M. Imbriani, 2006, Occupational risk and prevention in the biotechnology industry: a review: *La Medicina del lavoro*, v. 97, p. 651-75.
- Ferraro, M. J., M. A. Wikler, W. A. Craig, and M. N. Dudley, 2012, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-second informational Supplement, Pennsylvania, USA.
- Fontes, C. O., V. L. Silva, M. R. B. de Paiva, B. de Paiva, R. A. Garcia, J. A. Resende, A. B. Ferreira-Machado, and C. G. Diniz, 2013, Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of *mecA*-Encoding Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Soft Cheese in Brazil: *Journal of Food Science*, v. 78, p. M594-M599.
- Forbis, A., Betty, and D. Sahm, 1998, *Diagnostic Microbiology*.
- Fridkin, S. K., H. A. Hill, N. V. Volkova, J. R. Edwards, R. M. Lawton, R. P. Gaynes, J. E. McGowan, and I. P. Hosp, 2002, Temporal changes in prevalence of antimicrobial resistance in 23 US hospitals: *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, p. 697-701.
- Friese, A., J. Schulz, L. Hoehle, A. Fetsch, B. A. Tenhagen, J. Hartung, and U. Roesler, 2012, Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns: *Veterinary Microbiology*, v. 158, p. 129-135.
- Giske, C. et al, 2012, EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.
- Gerard, M., and S. Kornelia, 1998, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, p. pp 127-141.
- Ghoshal, U., K. N. Prasad, M. Singh, D. P. Tiwari, and A. Ayyagari, 2004, A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 10, p. 86-9.
- Gilbert, Y., M. Veillette, and C. Duchaine, 2010, Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms: *Aerobiologia*, v. 26, p. 185-194.

- Giske, C. G., L. Martinez-Martinez, and R. Cantón, 2013, EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.
- Goldstein, R. E. R., S. A. Micallef, S. G. Gibbs, J. A. Davis, X. He, A. George, L. M. Kleinfelter, N. A. Schreiber, S. Mukherjee, A. Sapkota, S. W. Joseph, and A. R. Sapkota, 2012, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detected at Four US Wastewater Treatment Plants: *Environmental Health Perspectives*, v. 120, p. 1551-1558.
- Graveland, H., J. A. Wagenaar, H. Heesterbeek, D. Mevius, E. van Duijkeren, and D. Heederik, 2010, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Veal Calf Farming: Human MRSA Carriage Related with Animal Antimicrobial Usage and Farm Hygiene: *Plos One*, v. 5.
- Guimaraes, D. O., L. D. Momesso, and M. T. Pupo, 2010, Antibiotics: Therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents: *Quimica Nova*, v. 33, p. 667-679.
- Hardy, K. J., P. M. Hawkey, F. Gao, and B. A. Oppenheim, 2004, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill: *British Journal of Anaesthesia*, v. 92, p. 121-130.
- Hope, R., D. M. Livermore, G. Brick, M. Lillie, R. Reynolds, and B. W. P. R. Su, 2008, Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 1165-1174.
- Hota, B., 2004, Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection?: *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, p. 1182-1189.
- Institute, N. F., 2012, Protocol for PCR amplification of *mecA*, *mecC* (*mecALGA251*), *spa* and *pvl* recommended by the eurl-ar.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, and L. N. Ornston, 1989, *Microbiologia Médica*.
- Jorgensen, J. H., and D. F. Sahm, 1995, Antimicrobial Susceptibility Testing: General Considerations, in P. R. Murray, ed., *Manual of Clinical Microbiology*: Washington, p. 1277-1320.
- JR., Q. R., and C. P., 1995, Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents, in E. Editors, ed., *Manual of Clinical Microbiology*.
- Kao, C. C., M. F. Liu, C. F. Lin, Y. C. Huang, P. Y. Liu, C. W. Chang, and Z. Y. Shi, 2010, Antimicrobial Susceptibility and Multiplex PCR Screening of AmpC Genes From Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter*



- freundii, and *Serratia marcescens*: *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, v. 43, p. 180-187.
- Karchmer, A. W., 2000, Nosocomial bloodstream infections: Organisms, risk factors, and implications: *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, p. S139-S143.
- Kim, S., J. N. Jensen, D. S. Aga, and A. S. Weber, 2007, Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge: *Chemosphere*, v. 66, p. 1643-1651.
- Kummerer, K., 2004, Resistance in the environment: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 311-320.
- Kummerer, K., 2009a, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I: *Chemosphere*, v. 75, p. 417-434.
- Kummerer, K., 2009b, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II: *Chemosphere*, v. 75, p. 435-441.
- Lambert, P. A., 2005, Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1471-1485.
- Lane, S. R., and R. D. E. Sewell, 2006, Correlative measurement of four biological contaminants on cotton lint, and their implications for occupational health: *International Journal of Occupational and Environmental Health*, v. 12, p. 120-125.
- Laurent, F., H. Chardon, M. Haenni, M. Bes, M.-E. Reverdy, J.-Y. Madec, E. Lagier, F. Vandenesch, and A. Tristan, 2012, MRSA Harboring *mecA* Variant Gene *mecC*, France: *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 1465-1467.
- Leclercq, R., R. Canton, D. F. J. Brown, C. G. Giske, P. Heisig, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, P. Nordmann, A. C. Rodloff, G. M. Rossolini, C. J. Soussy, M. Steinbakk, T. G. Winstanley, and G. Kahlmeter, 2013, EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, p. 141-160.
- [Lei n.º 102/2009. Diário da República n.º 176, Série I de 2009-09-10](#) - Assembleia da República
- Levy, S. B., 2001, Antibiotic resistance: Consequences of inaction: *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. S124-S129.
- Levy, S. B., and B. Marshall, 2004, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses: *Nature Medicine*, v. 10, p. S122-S129.

- Li, C. S., and P. A. Hou, 2003, Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms: *Science of the Total Environment*, v. 305, p. 169-176.
- Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne, 1999, Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia: *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p. 1128-1132.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet, 2012, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 268-281.
- McGowan, J. E., 1983, Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use: *Reviews of Infectious Diseases*, v. 5, p. 1033-1048.
- Mogato M., and D. E., 2011, OMS alerta que mau uso de remédios afeta combate a doenças. Acedido a 02-03-2013. Publicado em: <http://m.g1.globo.com/mundo/noticia/2011/04/oms-alerta-que-mau-uso-de-remedios-afeta-combate-a-doencas.html>.
- Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe, 1991, Identification of Methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain-reaction: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2240-2244.
- Muyzer, G., E. C. Dewaal, and A. G. Uitterlinden, 1993, Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700.
- Nagulapally, S. R., A. Ahmad, A. Henry, G. L. Marchin, L. Zurek, and A. Bhandari, 2009, Occurrence of Ciprofloxacin-, Trimethoprim-Sulfamethoxazole-, and Vancomycin-Resistant Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant: *Water Environment Research*, v. 81, p. 82-90.
- Nakagawa, S., I. Taneike, D. Mimura, N. Iwakura, T. Nakayama, T. Emura, M. Kitatsuji, A. Fujimoto, and T. Yamamoto, 2005, Gene sequences and specific detection for Pantone-Valentine leukocidin: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 328, p. 995-1002.
- Nascimento, T. C., W. D. Januzzi, M. Leonel, V. L. da Silva, and C. G. Diniz, 2009, Occurrence of clinically relevant bacteria in health service waste in

a Brazilian sanitary landfill and antimicrobial susceptibility profile: *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, v. 42, p. 415-419.

Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, 2011, Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 1791-1798.

Olayinka, B. O., O. A.T., O. A.F., O. J.A., and O. P.F., 2009, Absence of *mecA* gene in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *Afr. J. Infect. Diseases*.

Oliveira, D. E. d., 2011, Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e B-lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados, Universidade São Paulo - Faculdade Saúde Pública.

OMS, O. M. d. S., 2011, Carbapenemases do tipo "New Delhi metalobetalactamases" (NDM). Acedido em 26-06-2014. [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2642&Itemid=1](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=2642&Itemid=1),

Oppliger, A., N. Charriere, P. O. Droz, and T. Rinsoz, 2008, Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; Use of real-time PCR for airborne bacterial quantification: *Annals of Occupational Hygiene*, v. 52, p. 405-412.

Osswald, W. 2001, "Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas – Manual de Farmacologia e Farmacoterapia": Porto.

Paterson, D. L., 2006, Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae: *American Journal of Infection Control*, v. 34, p. S20-S28.

Perazzi, B., M. R. Fermepin, A. Malimovka, S. D. Garcia, M. Orgambide, C. A. Vay, R. de Torres, and A. A. R. Famiglietti, 2006, Accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in coagulase-negative staphylococci: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 3634-3639.

Pitout, J. D. D., and K. B. Laupland, 2008, Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern: *Lancet Infectious Diseases*, v. 8, p. 159-166.

Pitout, J. D. D., P. Nordmann, K. B. Laupland, and L. Poirel, 2005, Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 52-59.

Polat, Y., C. Ergin, I. Kaleli, and A. Pinar, 2007, Investigation of Legionella pneumophila seropositivity in the professional long distance drivers as a risky occupation: Mikrobiyoloji Bulteni, v. 41, p. 211-217.

[Portaria n.º 405/98. Diário da República n.º 158, Série I-B de 1998-07-11](#) - Ministérios da Saúde e do Trabalho e da Solidariedade.

[Portaria n.º 1036/98. Diário da República n.º 288, Série I-B de 1998-12-15](#) - Ministérios da Saúde e do Trabalho e da Solidariedade.

Price, L. B., J. P. Graham, L. G. Lackey, A. Roess, R. Vailes, and E. Silbergeld, 2007, Elevated risk of carrying gentamicin-resistant Escherichia coli among US poultry workers: Environmental Health Perspectives, v. 115, p. 1738-1742.

Radon, K., B. Danuser, M. Iversen, E. Monso, C. Weber, J. Hartung, K. J. Donham, U. Palmgren, and D. Nowak, 2002, Air contaminants in different European farming environments: Annals of Agricultural and Environmental Medicine, v. 9, p. 41-48.

Reiman, M., and J. Uitti, 2000, Exposure to microbes, endotoxins and total dust in cigarette and cigar manufacturing: an evaluation of health hazards: Annals of Occupational Hygiene, v. 44, p. 467-473.

Schluter, A., R. Szczepanowski, A. Puhler, and E. M. Top, 2007, Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool: Fems Microbiology Reviews, v. 31, p. 449-477.

Sebastian, A., A. M. Madsen, L. Martensson, D. Pomorska, and L. Larsson, 2006, Assessment of microbial exposure risks from handling of biofuel wood chips and straw - Effect of outdoor storage: Annals of Agricultural and Environmental Medicine, v. 13, p. 139-145.

Shiomori, T., H. Miyamoto, and K. Makishima, 2001, Significance of airborne transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an otolaryngology-head and neck surgery unit: Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, v. 127, p. 644-648.

Silbergeld, E. K., J. Graham, and L. B. Price, 2008, Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health, Annual Review of Public Health: Annual Review of Public Health, v. 29: Palo Alto, Annual Reviews, p. 151-169.

Singer, R. S., R. Finch, H. C. Wegener, R. Bywater, J. Walters, and M. Lipsitch, 2003, Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings: Lancet Infectious Diseases, v. 3, p. 47-51.

- Sousa, J. C., 2005, Manual de Antibióticos Antibacterianos.
- Stegger, M., P. S. Andersen, A. Kearns, B. Pichon, M. A. Holmes, G. Edwards, F. Laurent, C. Teale, R. Skov, and A. R. Larsen, 2012, Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)*: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 395-400.
- Sujauddin, M., S. M. S. Huda, and A. Hoque, 2008, Household solid waste characteristics and management in Chittagong, Bangladesh: *Waste Management*, v. 28, p. 1688-1695.
- Swenson, J. M., K. F. Anderson, D. R. Lonsway, A. Thompson, S. K. McAllister, B. M. Limbago, R. B. Carey, F. C. Tenover, and J. B. Patel, 2009, Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 2013-2017.
- Tang, J. W., Y. Li, I. Eames, P. K. S. Chan, and G. L. Ridgway, 2006, Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises: *Journal of Hospital Infection*, v. 64, p. 100-114.
- Tenover, F. C., 2001, Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview: *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. S108-S115.
- Tenover, F. C., 2006, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria: *American Journal of Medicine*, v. 119, p. S3-S10.
- Tenover, F. C., and J. E. McGowan, 1996, Reasons for the emergence of antibiotic resistance: *American Journal of the Medical Sciences*, v. 311, p. 9-16.
- Thiele-Bruhn, S., and I. C. Beck, 2005, Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass: *Chemosphere*, v. 59, p. 457-465.
- Uchida, M., H. Hatayoshi, A. Syuku-nobe, T. Shimoyama, T. Nakayama, A. Okuwaki, T. Nishino, and H. Hemmi, 2009, Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis of microbial community structure in landfill leachate: *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 1503-1508.
- Utsui, Y., and T. Yokota, 1985, Role of an altered Penicillin-binding Protein in methicillin-resistant and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 28, p. 397-403.

- Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne, 2003, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence: *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 978-984.
- Vasconcelos, M., Veiga J.M., Ramos C., Fernandes P., Vaz Velho M., Gonçalves S. e Santos J (2011-2012) “ Avaliação do Risco Biológico em Unidades de Recolha Seletiva e Aterro Sanitário”, Projeto financiado pela Autoridade das Condições de Trabalho 51APJ/08.
- Watkinson, A. J., G. B. Micalizzi, G. M. Graham, J. B. Bates, and S. D. Costanzo, 2007, Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 5667-5670.
- Wright, G. D., 2005, Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1451-1470.
- Wright, G. D., 2007, The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity: *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 175-186.
- Zhang, T., M. Zhang, X. X. Zhang, and H. H. Fang, 2009a, Tetracycline Resistance Genes and Tetracycline Resistant Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae in Activated Sludge of Sewage Treatment Plants: *Environmental Science & Technology*, v. 43, p. 3455-3460.
- Zhang, Y. L., C. F. Marrs, C. Simon, and C. W. Xi, 2009b, Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp: *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 3702-3706.