



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA  
*EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO* DO CHÁ  
VERDE CONTRA MRSA DE ISOLADOS  
HOSPITALARES E DA COMUNIDADE**

ANA SOFIA SIMÕES ZEFERINO

DOUTORA EDNA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA  
SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA / CENTRO DE  
INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA - H&TRC

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

*Lisboa, 2020*

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA  
*EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO* DO CHÁ  
VERDE CONTRA MRSA DE ISOLADOS  
HOSPITALARES E DA COMUNIDADE**

ANA SOFIA SIMÕES ZEFERINO

DOUTORA EDNA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA  
SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA / CENTRO DE  
INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA - H&TRC

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

*Lisboa, 2020*

# Direitos de cópia

---

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saude de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2020 – Ana Sofia Simões Zeferino

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

# Dedicatória / Agradecimentos

---

Mais uma jornada que terminou, com todos os seus desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho. Não posso deixar de agradecer a todos os que fizeram parte dela e a tornaram possível, quer por estarem presentes no dia-a-dia, quer por viverem no meu coração.

Em primeiro lugar tenho de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Edna Ribeiro, por me incentivar a entrar nesta “aventura”, por toda a dedicação, empenho, paciência, sabedoria e principalmente por toda a amizade demonstrada ao longo destes anos.

À ESTeSL e ao serviço de Patologia Clínica por me proporcionarem as condições para a realização deste projeto.

À “Dream Team”, em especial a Joana Lóios, obrigada pela amizade, pelo apoio, pela paciência aquando das minhas crises existenciais e pela partilha de experiências.

Acredito que existe uma razão para que as nossas vidas se tenham cruzado!

Às amigas do coração, não de uma vida, mas para a vida, Edna e Raquel, agradeço de uma forma muito especial, por fazerem parte de mim há tantos anos, por terem estado nos melhores e piores momentos e por provarem que a amizade verdadeira é o melhor que temos.

Ao meu marido Sérgio que me acompanhou nesta jornada. Obrigada pelo amor, partilha, companheirismo, apoio incondicional e que principalmente nunca me deixou desistir. Agradeço a enorme compreensão e por acreditares sempre em mim. O meu muito obrigado! Amo-te!

Em memória do meu pai, que de certeza estará orgulhoso de mim. Sei que estás sempre comigo... Isto é para ti Pai!

À minha mãe e irmão, agradeço o apoio em todos os momentos difíceis do meu percurso académico. Obrigada pela ajuda ao me darem coragem e amor. Este trabalho também é dedicado a vocês.

Para terminar agradeço às duas pessoas mais importantes da minha vida, os meus filhos! Ao Salvador e Carolina, obrigada por terem dispensado o vosso tempo para me poder dedicar a este projeto. Espero que vos consiga compensar de todo o tempo de brincadeiras e atenção que tiveram de abdicar. A mamã ama-vos muito!

# Resumo

---

A resistência antimicrobiana de microrganismos patogênicos nos humanos, como o *Staphylococcus aureus*, é descrita pela Organização Mundial da Saúde como um desafio global para a saúde. Estirpes de MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA) têm diferenças significativas a nível de fatores de risco, resistência a antibióticos, taxa de crescimento, toxinas e ou fatores de virulência, quando comparadas com estirpes adquiridos em ambientes hospitalares (HA-MRSA). Estudos sugeriram a eficácia da Epigalocatequina-3-galato (EGCG), na reversão do fenótipo de resistência a MRSA *in vitro*.

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial sinérgico e antimicrobiano da EGCG na reversão do fenótipo de resistência em estirpes de *S. aureus* comensais e hospitalares. Foram utilizadas estirpes de *S. aureus* isoladas de infecções hospitalares de um hospital de Lisboa (n=32) e da nasofaringe de voluntários com exposição ocupacional a ambiente hospitalar (n=38) após leitura e assinatura do consentimento informado. O fenótipo de resistência do *S. aureus* foi caracterizado através de testes imunológicos e teste bioquímico (catalase). A suscetibilidade aos antibióticos e o sinergismo foram avaliados através do método por difusão em disco com e sem co-exposição à EGCG nas concentrações finais de 25, 50, 100 e 250 µg/ml.

Os resultados demonstraram o potencial antimicrobiano e sinergismo da EGCG com os antibióticos que inibem a síntese da parede celular, verificando-se a reversão do fenótipo de resistência nas estirpes de *S. aureus*, permitindo também verificar que existem divergências entre as estirpes comensais e hospitalares.

Este trabalho corrobora o potencial da EGCG para tratamento antimicrobiano e/ou adjuvante terapêutico contra microrganismos resistentes a antibióticos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; Epigalocatequina-3-galato; Resistência Antimicrobiana; Sinergismo.

# Abstract

---

The antimicrobial resistance of human pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, is described by the World Health Organization as a global health challenge. Community-acquired MRSA strains (CA-MRSA) have significant differences in risk level, antibiotic resistance, growth rate, toxins and or virulence factors, when compared to strains acquired in hospitals (HA-MRSA). Studies have suggested the efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in reversing the MRSA resistance phenotype *in vitro*.

This study aims to assess the synergistic and antimicrobial potential of EGCG in reversing the resistance phenotype in community and hospital *S. aureus* strains. Strains of *S. aureus* isolated from hospital infections in a Lisbon hospital (n = 32) and from the nasopharynx of volunteers with occupational exposure to a hospital environment (n = 38) were used after reading and signing the informed consent. The resistance phenotype of *S. aureus* was carried out through immunological tests and the catalase test. Susceptibility to antibiotics and synergism were assessed using the disk diffusion method with and without EGCG co-exposure at final concentrations of 25, 50, 100 and 250 µg / ml.

The results demonstrated the antimicrobial and synergistic potential of EGCG with antibiotics that inhibit cell wall synthesis, verifying the reversal of the resistance phenotype in *S. aureus* strains, also allowing to verify that there are differences between commensal and hospital strains.

This work corroborates the potential of EGCG for antimicrobial and / or therapeutic adjuvant treatment against antibiotic-resistant microorganisms.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Epigallocatechin-3-gallate; Antimicrobial Resistance; Synergism.



# Índice Geral

---

Direitos de cópia .....	iii
Dedicatória / Agradecimentos.....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Índice Geral .....	ix
Índice de tabelas .....	xiii
Índice de figuras .....	xv
Índice de gráficos .....	xvii
Abreviaturas.....	xix
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Estado de arte.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA) .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Estirpes isoladas de infecções hospitalares (HA-MRSA) .....	5
2.2.2 Estirpes isoladas da comunidade (CA-MRSA) .....	6
<b>2.3 Mecanismos de ação de antibióticos .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Antibióticos que inibem a síntese da parede celular .....	8
2.3.2 Antibióticos que atuam sobre a membrana celular .....	10
2.3.3 Antibióticos que inibem a síntese de proteínas.....	10
2.3.4 Antibióticos que inibem síntese de DNA .....	11
2.3.5 Antibióticos que atuam sobre o metabolismo (inibição ácido fólico).....	11
<b>2.4 Mecanismos de resistência a antibióticos .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5 Concentração mínima inibitória (CMI) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Epigallocatequina-3-galato (EGCG) .....</b>	<b>14</b>
2.6.1 Potencial sinérgico da EGCG.....	15
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Tipo de estudo e variáveis .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Amostra .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Procedimentos laboratoriais .....</b>	<b>20</b>
4.3.1 Colheita de exsudado nasofaríngeo .....	20
4.3.2 Identificação do <i>S. aureus</i> .....	20
4.3.2.1 Teste Bioquímico da Catalase .....	22
4.3.3 Recolha de estirpes isoladas de infecções hospitalares .....	23
4.3.4 Determinação da CMI .....	23

4.3.5 Teste de avaliação de sensibilidade a antibióticos (TSA) em estirpes recolhidas da comunidade .....	24
4.3.6 Teste sensibilidade a antibióticos (TSA) em estirpes recolhidas de infeções hospitalares .....	25
4.3.7 Avaliação do potencial sinergismo da EGCG .....	25
<b>4.5 Ética .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 Financiamento / Subsídios.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Prevalência de <i>S. aureus</i> em amostras da comunidade .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana de estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas da comunidade .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Sinergismo entre EGCG e estirpes com fenótipo de resistência em amostras recolhidas da comunidade .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4 Identificação e teste de sensibilidade a antibióticos de estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de infeções hospitalares .....</b>	<b>32</b>
<b>5.5 Sinergismo entre EGCG e estirpes com fenótipos de resistência em amostras de infeções hospitalares.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6 Co - exposição de EGCG com <i>Imipenem, Tetraciclina, Gentamicina e Amoxicilina</i> em estirpes isoladas da comunidade.....</b>	<b>39</b>
<b>5.7 Co-exposição de EGCG com <i>Imipenem, Tetraciclina, Gentamicina e Amoxicilina</i> em estirpes isoladas de infeções hospitalares .....</b>	<b>43</b>
<b>5.8 Crescimento de estirpes <i>S. aureus</i> da comunidade e de infeções hospitalares expostas a EGCG .....</b>	<b>46</b>
<b>6. Discussão de resultados e conclusão .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Conclusão .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Perspetivas futuras .....</b>	<b>55</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>66</b>
<b>Parecer da Comissão de ética para a saúde .....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>67</b>
<b>Parecer do Serviço de Patologia Clínica – seção de Microbiologia .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>69</b>
<b>Parecer do Conselho de Ética (CE) da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL).....</b>	<b>69</b>
<b>Apêndice I .....</b>	<b>70</b>
<b>Consentimento informado.....</b>	<b>70</b>
<b>Apêndice II .....</b>	<b>73</b>
<b>Média da zona de inibição (cm) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade .....</b>	<b>73</b>

Média das densidades óticas - comunidade .....	73
Média da zona de inibição (cm) das estirpes de MSSA hospitalares .....	73
Média da zona de inibição (cm) das estirpes de MRSA hospitalares .....	74
Média das densidades óticas - hospitalares .....	74
Valores de <i>p</i> para estirpes MSSA e MRSA da comunidade e hospitalares (18,24 e 48h)..	74
Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com <i>tetraciclina</i> 30µg - comunidade.....	75
Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com <i>gentamicina</i> 30µg .....	75
Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a amoxicilina 25µg em estirpes de MRSA de estirpes hospitalares .....	76
Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a tetraciclina 30µg em estirpes MSSA hospitalares .....	77
Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a tetraciclina 30µg, em estirpes de MRSA hospitalares .....	77
Sinergismo de EGCG com <i>imipenem</i> 10 µg em estirpes de MSSA hospitalares. ....	78



## Índice de tabelas

---

Tabela 4.1 – Intervalos da zona de inibição para determinar sensibilidades ou resistências a antibióticos .....	24
Tabela 5.1 - Prevalência de <i>S. aureus</i> em voluntários com exposição ocupacional, em que MSSA ( <i>S. aureus</i> sensível à meticilina) e MRSA ( <i>S. aureus</i> resistente à meticilina). .....	28
Tabela 5.2 - Antibiograma de estirpes de MSSA e MRSA isoladas da flora comensal de voluntários com <i>imipenem</i> 10µg, <i>tetraciclina</i> 30µg, <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg .....	29
Tabela 5.3 – Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com <i>imipenem</i> 10µg. ....	30
Tabela 5.4 - Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com <i>amoxicilina</i> 25µg. ....	31
Tabela 5.5 - Sensibilidades e Resistências de estirpes de MSSA isoladas de infecções hospitalares a antibióticos.....	32
Tabela 5.6 – Sensibilidades e Resistências de estirpes de MRSA isoladas de infecções hospitalares a antibióticos.....	34
Tabela 5.7 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a <i>amoxicilina</i> 25µg em estirpes de MSSA de infecções hospitalares .....	36
Tabela 5.8 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a <i>gentamicina</i> 30µg em estirpes de MSSA de infecções hospitalares.....	37
Tabela 5.9 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a <i>gentamicina</i> 30µg em estirpes de MRSA de infecções hospitalares .....	38
Tabela 5.10 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG com <i>imipenem</i> 10µg, em estirpes de MRSA hospitalares.....	39



# Índice de figuras

---

Figura 2.1 - <i>S. aureus</i> observados ao microscópio com coloração de Gram.....	3
Figura 2.2 - Ilustração dos fatores de virulência do <i>S. aureus</i> .....	4
Figura 2.3 - Caracterização das estirpes de MRSA, CA-MRSA, HA-MRSA e LA-MRSA	5
Figura 2.4 – Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA .....	7
Figura 2.5 – Diferentes mecanismos de ação de antibióticos.....	8
Figura 2.6 - Diferenças da parede celular em bactérias Gram negativa e Gram positiva .....	9
Figura 2.7- Estrutura química dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e monobactâmicos .....	9
Figura 2.8 – Mecanismo de ação dos antibióticos inibidores da síntese da parede celular.....	10
Figura 2.9 – Antibióticos inibidores da síntese de proteínas.....	11
Figura 2.10 – Diferentes mecanismos de resistência a antibióticos .....	12
Figura 2.11 - Esquema representativo da determinação da concentração mínima inibitória.....	13
Figura 2.12 - Estrutura química das principais catequinas do chá verde.....	14
Figura 2.13 - Exemplo de sinergismo.....	15
Figura 2.14 - Exemplos de sinergismo do chá verde com diferentes antibióticos.....	16
Figura 4.1 - Exemplo de colheita de exsudado nasofaríngeo.....	20
Figura 4.2 – Colónias suspeitas de <i>S. aureus</i> em gelose de Columbia agar .....	21
Figura 4.3 - Meio cromogénico CHROMID®MRSA da <i>Biomérieux</i> .....	21
Figura 4.4 – Exemplo de teste de aglutinação de partículas em latex.....	22
Figura 4.5 - Teste da catalase .....	22
Figura 4.6 - VITEK MS e VITEK 2.....	23
Figura 4.7 – Carta P-648 .....	25



## Índice de gráficos

---

Gráfico 5.1 – Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 18h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade.....	41
Gráfico 5.2 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 24h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade.....	42
Gráfico 5.3 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 48h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade.....	42
Gráfico 5.4 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 18h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares.....	44
Gráfico 5.5 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 24h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares.....	45
Gráfico 5.6 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 48h ( <i>imipenem</i> 10µg; <i>tetraciclina</i> 30µg; <i>gentamicina</i> 30µg e <i>amoxicilina</i> 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares.....	45
Gráfico 5.7 - Densidades óticas de <i>S. aureus</i> (MSSA e MRSA) de estirpes da comunidade com as diferentes concentrações de EGCG.....	47
Gráfico 5.8 - Densidades óticas de <i>S. aureus</i> (MSSA e MRSA) de estirpes de infecções hospitalares com as diferentes concentrações de EGCG.....	47



# Abreviaturas

---

**30S** - Sub-unidade 30 do ribossoma

**50S** - Sub-unidade 50 do ribossoma

**ATB** - Antibióticos

**CA-MRSA** – Community associated MRSA (MRSA associados à comunidade)

**CLSI** - Clinical and Laboratories Standards Institute

**CMI** - Concentração mínima inibitória

**DNA** - Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

**DO** - Densidade ótica

**EGCG** - Epigallocatequina-3-galato

**EUCAST** - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana)

**H & TRC** - Health & Technology Research Center (Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia)

**HA-MRSA** - Health care-associated MRSA (MRSA associados a cuidados de saúde)

**LA-MRSA** - Livestock-associated MRSA (MRSA associado à pecuária)

**MH** - Mueller Hinton

**MHB** - Mueller Hinton Broth

**MRSA** - Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina)

**MSCRAMMs** - “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”  
componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão à matriz

**NAG** - N-acetil-glicosamina

**NAM** - Ácido N-acetilmurâmico

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PBP** - Proteína de ligação à penicilina

**RNA** - Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

**S. aureus** - *Staphylococcus aureus*

**SCCmec** - *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

**TSA** - Teste suscetibilidade a antibióticos

**TSST** - Toxina do síndrome do choque tóxico

**β-lactâmicos** - Beta lactâmicos

# 1. Introdução

---

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define a resistência aos antibióticos de microrganismos patogênicos para humanos, como um grave problema mundial com consequências não só a nível da saúde como também na economia do país.

Com o crescente aumento de microrganismos resistentes a antibióticos nas últimas décadas, surgiram preocupações sociais e científicas no que respeita à prescrição e uso intensivo de antibióticos (1–4).

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram positiva, que coloniza preferencialmente a nasofaringe de indivíduos saudáveis, sendo a maior parte das estirpes sensíveis a vários antibióticos. Pode também provocar intoxicação alimentar estafilocócica resultantes da ingestão de enterotoxinas presentes nos alimentos contaminados (5,6). No entanto, existem estirpes como o *Staphylococcus aureus* *meticilina resistente* (MRSA) que são resistentes à meticilina, como o nome indica e a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o que dificulta o tratamento fazendo com que este seja o causador de infeções graves tanto a nível hospitalar como na comunidade, associado a uma elevada morbidade e taxa de mortalidade (5,7–9).

Ao longo da sua evolução, o *S. aureus* adquiriu esta resistência mediada pelo gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina (PBP2a ou PBP2'). A PBP2a está localizada na parede celular bacteriana e tem baixa afinidade de ligação para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (10–16).

Atualmente as infeções por MRSA são caracterizadas como infeções por MRSA associadas a infeções hospitalares (HA-MRSA), associadas à comunidade (CA-MRSA) e associadas à pecuária (LA-MRSA) (17,18).

Ao longo destes últimos anos, vários estudos tentaram encontrar novas abordagens focadas no uso de produtos ou compostos naturais com propriedades terapêuticas (11,19,20).

Uma dessas abordagens foi o uso do chá verde e o estudo das suas propriedades benéficas (21–23). O chá verde é conhecido como uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. É produzido principalmente em países asiáticos a partir das folhas da planta *Camellia sinensis*. A sua composição química inclui, entre outros componentes os polifenóis (flavonóides e catequinas), responsáveis pelas propriedades benéficas. As quatro principais catequinas deste chá são: a *epicatequina* (EC), a *epicatequina-3-galato* (ECG), a *epigalocatequina* (EGC) e a *epigalocatequina-*

3-galato (EGCG) (11,22,24). Sabe-se que a EGCG tem propriedades anti-infecciosas demonstradas em vários estudos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (por exemplo *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Enterococcus* spp) em alguns fungos (*Candida albicans*) e vírus (HIV, *Herpes simplex*, Influenza) (11,24,25).

Estudos *in vitro* comprovaram a eficácia do EGCG na reversão do fenótipo de resistência do MRSA (26,27).

Neste contexto, e tendo como questão de partida o potencial terapêutico da EGCG na reversão de fenótipo de resistência a agentes antimicrobianos como o *S. aureus*, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano da EGCG contra estirpes de *S. aureus* isoladas de infecções hospitalares (HA) e da comunidade (CA), assim como verificar o potencial sinergismo da EGCG com antibióticos (ATB) com diferentes modos de acção.

## 2. Estado de arte

---

### 2.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, em forma de cocos (**figura 2.1**) e está entre os microrganismos patogênicos mais comuns que causam infecções hospitalares e infecções adquiridas na comunidade, tendo sérias consequências para a saúde pública. Na Europa, é o segundo microrganismo causador de bacteriemia, e é uma das principais causas de sépsis em todo o mundo (16,28).

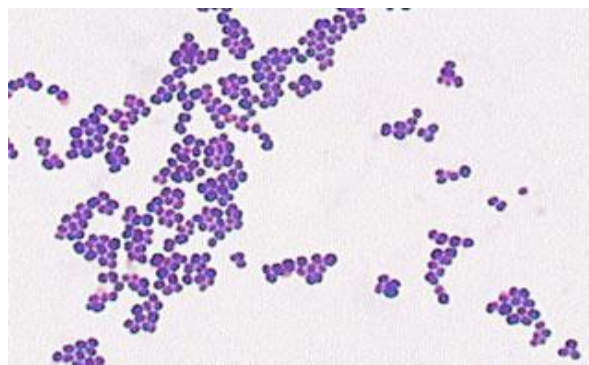


Figura 2.1 - *S. aureus* observados ao microscópio com coloração de Gram, retirada de [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com), acessado em 3 setembro 2020.

É um microrganismo comensal que encontrando as condições ideais pode causar infecções mais graves como endocardites, síndrome de choque tóxico entre outras, assim como também provocar intoxicações alimentares, resultado da produção de enterotoxina estafilocócica presente em alimentos contaminados originando vômitos, diarreia e prostração (5,15,29). O *S. aureus* possui vários fatores de virulência que ajudam na ligação à célula hospedeira, comprometendo o sistema imunitário, invadindo tecidos causando síndromas mediados por toxinas (30).

Consoante o mecanismo de ação e o seu papel na patogênese, os fatores de virulência do *S. aureus* podem ser classificados em: a) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão à matriz - *MSCRAMMs*, produção de moléculas de fibrinogénio, fibronectina, colagénio ou da enzima coagulase); b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro (enterotoxinas estafilocócicas, toxina do síndrome do choque tóxico (TSST), proteína A); e c) fatores relacionados com a

invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses (toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  – hemolisinas) (figura 2.2) (6,31).

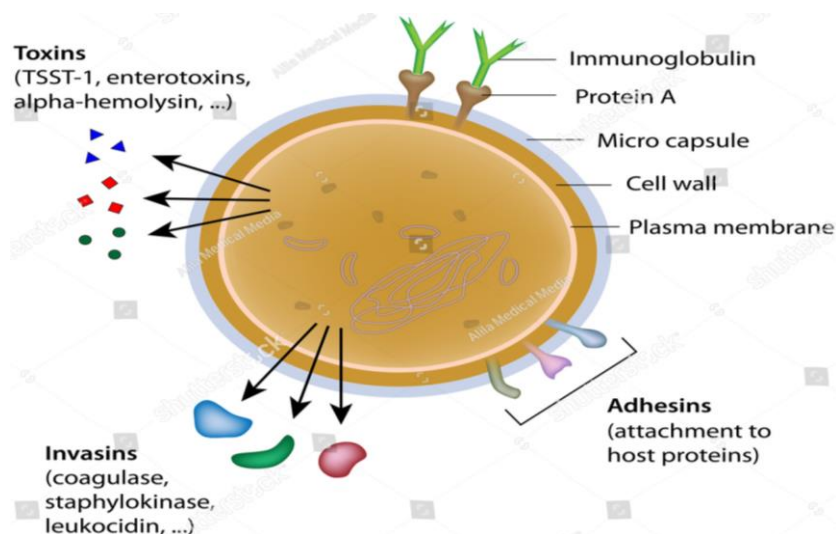


Figura 2.2 - Ilustração dos fatores de virulência do *S. aureus*, retirada de <https://www.shutterstock.com/pt/image-illustration/staphylococcus-aureus-bacterium-166170122>, acessado a 14 outubro 2020.

Uma das características biológicas fundamentais do *S. aureus* é a sua aptidão para colonizar a população saudável de forma assintomática. Apesar de colonizar diferentes zonas do corpo humano como axilas, mãos, virilhas, mucosas, entre outros, tem como preferência a nasofaringe (16,32–34).

Em Portugal, a preocupação com a saúde ocupacional tem vindo a aumentar e têm sido feitos esforços no sentido de padronizar procedimentos para a avaliação da exposição em ambientes ocupacionais (5,33).

É encontrado essencialmente na nasofaringe mas também nas mãos, sendo a estratégia de controlo a higienização das mãos uma boa forma de prevenir a sua transmissão e ajudando na diminuição de infeções por MRSA (16,17,33).

## 2.2 *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)

A resistência à meticilina no *S. aureus* é primariamente conferida pelo gene *mecA* que codifica a proteína de ligação à penicilina (PBP2a ou PBP2') que possui baixa afinidade a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. O gene *mecA* faz parte de um elemento genético móvel - "*staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)*" (10–13,35,36).

Esta resistência é um enorme desafio para a medicina em termos de tratamento e

controlo de infeções por *Staphylococcus* (16). A capacidade de *S. aureus* de adquirir genes que conferem resistência a antibióticos combinada com a mutação de genes hospedeiros, facilitou a evolução de um microrganismo patogénico multi-resistente para o qual as opções de tratamento podem ser severamente limitadas (13–15). Atualmente a comunidade científica caracteriza as estirpes de MRSA em CA-MRSA associadas à comunidade; HA-MRSA associadas a cuidados de saúde e a infeções hospitalares e LA-MRSA associada à pecuária (**figura 2.3**) (14,37).

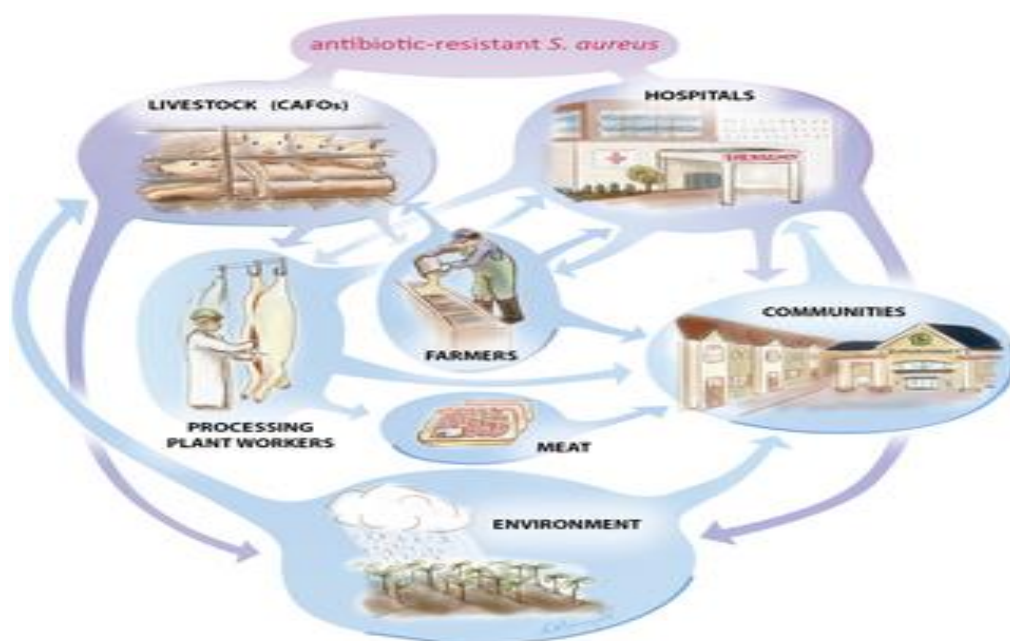


Figura 2.3 - Caracterização das estirpes de MRSA, CA-MRSA, HA-MRSA e LA-MRSA, adaptado de (38)

### 2.2.1 Estirpes isoladas de infeções hospitalares (HA-MRSA)

O HA-MRSA afeta em maior número pacientes internados em hospitais ou lares, idosos e recém-nascidos. Como fatores de risco para o surgimento do HA-MRSA temos o uso prolongado de antibióticos, longos internamentos, cirurgias e material hospitalar (como por exemplo catéteres, sondas, etc.). A transmissão deste microrganismo é feita essencialmente através de contacto de pessoa para pessoa (aqui encontra-se incluído o pessoal de saúde, doentes, visitantes e equipamentos hospitalares manuseados) (5,16,30).

Estudos referem que exposições prolongadas a bio-aerossóis, particularmente no local de trabalho, pode representar um risco para a saúde e potencialmente resultar em

doenças infecciosas tanto para trabalhadores quanto para a disseminação desses microrganismos na comunidade (5,33).

### 2.2.2 Estirpes isoladas da comunidade (CA-MRSA)

O CA-MRSA tem vindo a surgir como um microrganismo patogénico com um significado clínico associado a infeções particularmente em indivíduos jovens saudáveis, assintomáticos. Estas estirpes de MRSA conjugam a resistência à meticilina com maior virulência, causando doenças altamente invasivas, progressivas e potencialmente fatais tornando-se num problema de saúde pública associado à comunidade (33). As estirpes CA-MRSA, causam maioritariamente doenças da pele e dos tecidos moles, manifestando-se desde furúnculos a fasciites necrosantes. Têm sido identificados como fatores de risco para a infeção por CA-MRSA a partilha de itens pessoais, lesões de pele negligenciadas e falta de higiene (30,36).

Uma característica importante é o perfil de resistência a antibióticos, enquanto as estirpes de HA-MRSA se caracterizam por uma ampla resistência a vários antibióticos, as estirpes de CA-MRSA demonstram uma elevada sensibilidade a vários antibióticos como a *gentamicina*, *clindamicina*, *sulfametoxazol / trimetoprim*, *ciprofloxacina* e *vancomicina* (6,31,39).

Characteristic	HA-MRSA	CA-MRSA
Population affected	patients or residents in hospitals or nursing homes, the elderly, pre-term neonates, immunocompromised	young healthy individuals in the community with no risk factors for acquisition of HA-MRSA, prisoners, military personnel, athletes, male homosexuals, ethnic populations (native Alaskans and American Indians, Hawaiian islanders)
Site of infection	bacteraemia and wound infections also symptomatic infections of respiratory and urinary tracts	mainly skin [abscesses and cellulitis, furunculosis, severe skin and soft tissue infections (sSSTIs)] in severe cases, septic shock and bacteraemia, necrotizing pneumonia
Risk factors	indwelling devices, catheters, lines, haemodialysis, prolonged hospitalization, long-term antibiotic use	close physical contact, abrasion injuries, activities associated with poor communal hygiene (e.g. sharing towels)
Transmission	(i) person-to-person spread via healthcare staff (e.g. nurses, doctors, surgeons and physiotherapists), visitors and patients (ii) environment-to-patient spread e.g. via hospital equipment	(i) person-to-person via shared facilities (e.g. sports equipment, towels, pools, etc.) (ii) environment

Figura 2.4 – Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA, população afetada, local de infecção, fatores de risco e principais vias de transmissão, adaptado de (37)

## 2.3 Mecanismos de ação de antibióticos

A capacidade dos antibióticos para tratar e curar as infecções melhorou significativamente a qualidade de vida reduzindo a mortalidade. O seu uso cada vez mais difundido e muitas vezes de forma incorreta e exagerada, levaram ao rápido aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos, tornando-se num problema de saúde pública em todo o mundo (40–42).

Os antibióticos podem ser bacteriostáticos, ou seja, inibem o crescimento mantendo-o numa fase estacionária, ou bactericidas matando os microrganismos (43).

Podemos classificar os antibióticos segundo os seus mecanismos de ação, ou seja, sobre o local onde é exercido o seu efeito antibacteriano afetando a estrutura e função levando à morte celular (44,45). Assim, são descritos 5 mecanismos de ação (**figura 2.5**): inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese de proteínas; inibição da síntese de ácidos nucleicos; destruição da função da membrana celular, e inibição da síntese de ácido fólico (inibição do metabolismo) (44,46,47).

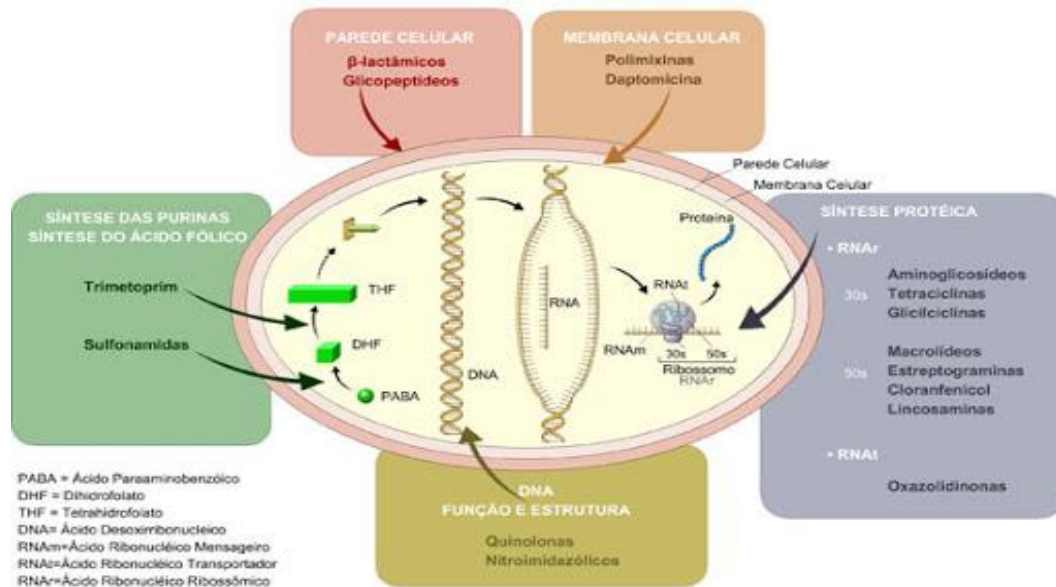


Figura 2.5 – Diferentes mecanismos de ação de antibióticos: inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese de proteínas; inibição da síntese de ácidos nucleicos; destruição da função da membrana celular, e inibição da síntese de ácido fólico (inibição do metabolismo), retirado de [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/mecanismos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/mecanismos.htm), acessado a 29 setembro 2020

### 2.3.1 Antibióticos que inibem a síntese da parede celular

Para a sobrevivência de qualquer bactéria é essencial manter a integridade da parede celular. É importante referir que a parede celular das bactérias Gram positivas é diferente das Gram negativas. A principal diferença está nas camadas de peptidoglicano constituído principalmente por *N-acetil-glicosamina* (NAG) e *ácido N-acetilmurâmico* (NAM) que formam a parede celular, como se pode observar na **figura 2.6** (44,48).

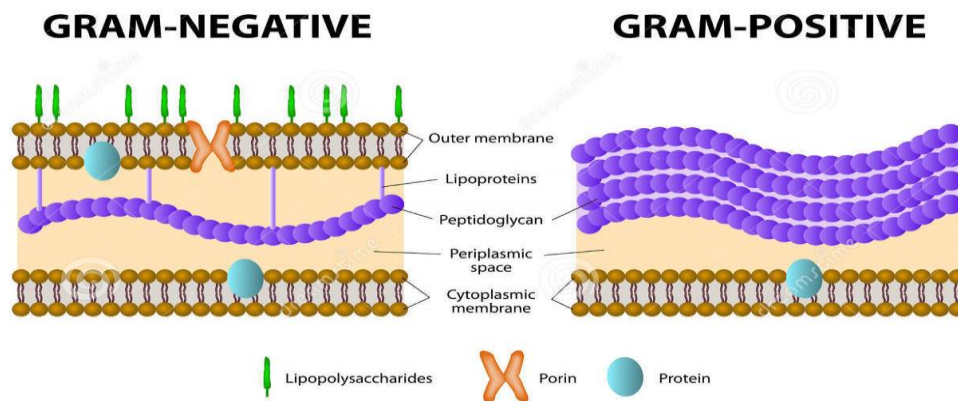


Figura 2.6 - Diferenças da parede celular em bactérias Gram negativa e Gram positiva, retirada de <https://pt.dreamstime.com/ilustração-stock-bactérias-grama-positivas-e-grama-negativas-image45337024>, acessado a 29 setembro 2020.

Os antibióticos com ação a nível da síntese da parede bacteriana pertencem aos  $\beta$ -lactâmicos, e são os antibióticos mais usados na prática clínica devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade (49). São agentes bactericidas, uma vez que danificam a parede celular comprometendo a integridade da bactéria (50). Esta classe de antibióticos é constituída por *penicilinas*, *cefalosporinas*, *carbapenemes* e *monobactâmicos*, e possuem em comum o anel  $\beta$ -lactâmico que confere a actividade farmacológica (figura 2.7) (49,51).

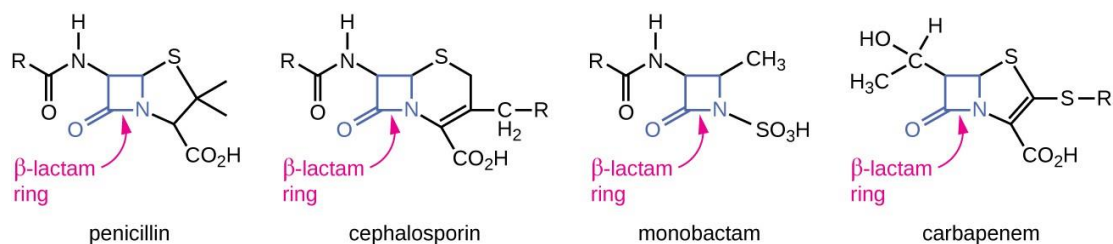


Figura 2.7 – Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e monobactâmicos, adaptado de <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>, acessado a 12 outubro 2020

Os principais “alvos” dos  $\beta$ -lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), e ao inibir a função das PBPs, o peptidoglicano não pode ser sintetizado adequadamente e a parede celular fica fragilizada, levando à lise e por consequente à sua morte (figura 2.8) (29,49,52,53). A *amoxicilina* e o *imipenem* (sub-grupo das carbapenemes) têm como mecanismo de ação a síntese de peptidoglicano,

interferindo assim na síntese da parede celular bacteriana levando à lise celular (54,55).

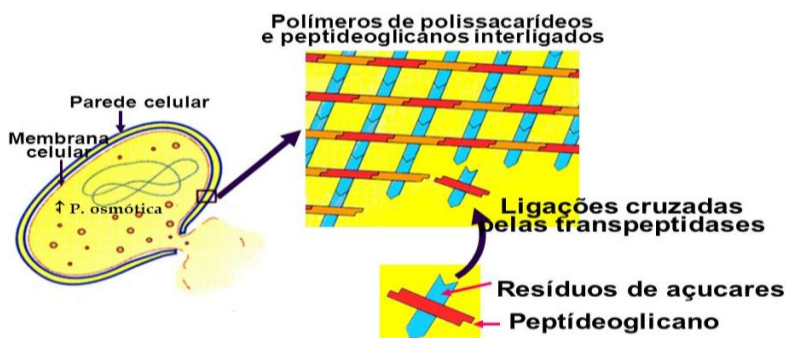


Figura 2.8 – Mecanismo de ação dos antibióticos inibidores da síntese da parede celular, adaptado de <https://slideplayer.com.br/slide/9932783/>, acessado a 22 outubro 2020.

### 2.3.2 Antibióticos que atuam sobre a membrana celular

Os antibióticos que atuam sobre a membrana celular, penetram na membrana citoplasmática das bactérias Gram positivas alterando a permeabilidade da membrana e como consequência provocando a morte celular bacteriana (56).

### 2.3.3 Antibióticos que inibem a síntese de proteínas

Os ribossomos bacterianos são formados por duas sub-unidades – a subunidade 30S e a subunidade 50S que se unem formando a unidade 70S, sendo responsáveis pela síntese de proteínas. Os antibióticos que inibem a síntese proteica dividem-se em dois grupos: os que atuam sobre a subunidade 30S (ex. *tetraciclina* e *aminoglicosídeos*) e os que atuam sobre a subunidade 50S (ex. *macrólidos*, *cloranfenicol* e *lincosamidas*) impedindo a síntese de proteínas (**figura 2.9**) (44,47,56). A *gentamicina* é um antibiótico de amplo espectro na classe dos aminoglicosídeos (2,57) e o seu mecanismo de ação é a sua ligação à subunidade ribossomal 30S, incapacitando a bactéria de sintetizar proteínas (2,57,58). A *tetraciclina* é um antibiótico de largo espectro que inibe o crescimento bacteriano ao inibir a tradução, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma, interferindo na síntese de proteínas (59).

### Major classes of protein synthesis-inhibiting antibacterials

#### Chloramphenicol, macrolides, and lincosamides

- Bind to the 50S ribosomal subunit
- Prevent peptide bond formation
- Stop protein synthesis

#### Aminoglycosides

- Bind to the 30S ribosomal subunit
- Impair proofreading, resulting in production of faulty proteins

#### Tetracyclines

- Bind to the 30S ribosomal subunit
- Block the binding of tRNAs, thereby inhibiting protein synthesis

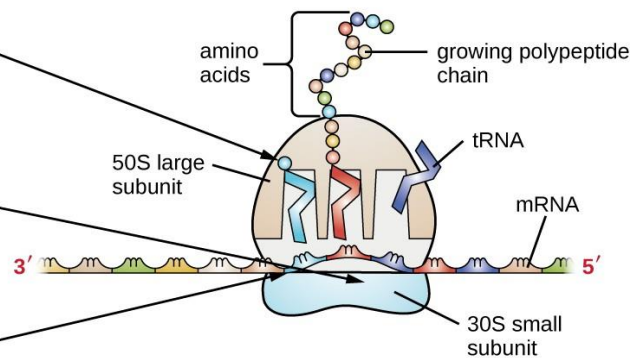


Figura 2.9 – Antibióticos inibidores da síntese de proteínas com atuação nas subunidades 30S e 50S do ribossoma bacteriano, adaptado de <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>, acessado a 1 outubro 2020.

### 2.3.4 Antibióticos que inibem síntese de DNA

Os antibióticos que atuam a nível dos ácidos nucleicos, podem atuar inibindo a atividade da RNA polimerase bloqueando a transcrição (como a *rifampina*), ou podem atuar sobre a DNA-girase (enzima que faz o desenrolamento das cadeias de DNA) bloqueando a replicação do DNA (como a *ciprofloxacina* que pertence ao grupo das quinolonas) (44,47).

### 2.3.5 Antibióticos que atuam sobre o metabolismo (inibição ácido fólico)

Alguns antibióticos controlam as infecções bacterianas atuando como antimetabólitos, inibidores competitivos das enzimas metabólicas bacterianas. Ao inibir a enzima envolvida na produção de ácido di-hidrofólico, as sulfonamidas bloqueiam a biossíntese bacteriana do ácido fólico e, subsequentemente, das pirimidinas e purinas necessárias para a síntese do ácido nucleico. Este mecanismo de ação tem efeito bacteriostático do crescimento. Como os humanos obtêm ácido fólico dos alimentos em vez de sintetizá-lo intracelularmente, as sulfonamidas são seletivamente tóxicas para as bactérias (56)

## 2.4 Mecanismos de resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos é classificada como uma das maiores ameaças à saúde pública, sendo importante assim entender os mecanismos pelas quais as bactérias conseguem resistir à sua ação (47).

O uso de antibióticos cada vez mais difundido e muitas vezes de forma incorreta e exagerada, levaram ao rápido aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos, tornando-se num problema de saúde pública em todo o mundo (40–42).

A resistência aos antibióticos, ocorre quando estes perdem a capacidade de controlar o crescimento ou morte bacteriana, ou seja, uma bactéria resistente continua a multiplicar-se na presença de níveis terapêuticos desse antibiótico (60).

A resistência aos antibióticos (**figura 2.11**) pode ser desenvolvida de variadas formas, mas as bactérias conseguem evitar os seus efeitos devido a 4 mecanismos principais: *a) modificação ou destruição enzimática do antibiótico* (ex. destruição dos  $\beta$ -lactâmicos pelas  $\beta$ -lactamases que provocam hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico antes da sua ligação às PBPs); *b) bombas de efluxo* (promovem o efluxo do antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular); *c) alteração nas moléculas alvo dos antibióticos* (devido à perda total da afinidade ou a sua simples redução) ; *d) alteração da permeabilidade da membrana celular bacteriana* (modificando o local de ligação do antibiótico) (46,47,61).

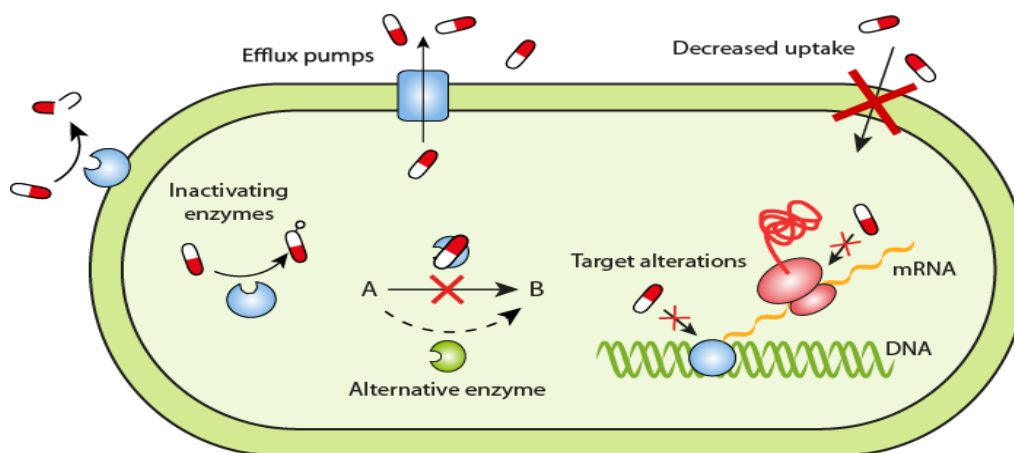


Figura 2.10 – Diferentes mecanismos de resistência a antibióticos, adaptado de <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria>, acedido a 14 setembro 2020.

No *S. aureus* a resistência aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações nos genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias, que podem ser de espécies do mesmo género ou de géneros diferentes. Estudos descrevem que a

resistência à meticilina é determinada pelo gene *mecA*, o qual codifica para modificações no receptor do  $\beta$ -lactâmico, estimulando a produção da proteína de ligação à penicilina (PPB2a) com baixa afinidade pelo antibiótico, resultando na resistência, fazendo com que a bactéria resista ao tratamento. Este tipo de resistência é a base da resistência para MRSA (6,32,62). Uma das características das estirpes de MRSA é a sua resistência não apenas a  $\beta$ -lactâmicos, o que torna as infecções por MRSA mais difíceis de tratar, tendo consequências na duração de tratamento nos custos associados (8).

## 2.5 Concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano, que inibe completamente o crescimento do microrganismo, detetado a olho nu. Para identificar a CMI em meio líquido, quantidades idênticas de bactérias após isolamento de uma cultura pura são inoculadas no meio líquido com antimicrobiano em diluições que vão diminuindo progressivamente. A CMI está entre as concentrações do último tubo/placa em que nenhuma bactéria cresceu, e a próxima dose menor que permitiu o crescimento bacteriano (**figura 2.12**). As CMI são importantes na medida em que permitem confirmar a resistência de um microrganismo a um agente antimicrobiano e também para monitorizar a atividade de novos agentes antimicrobianos (63).

De uma forma sucinta, a CMI, é obtida através do crescimento do microrganismo em tubo, pocetos ou placa que contém o antibiótico com diferentes concentrações até se determinar o ponto final de crescimento (64,65).

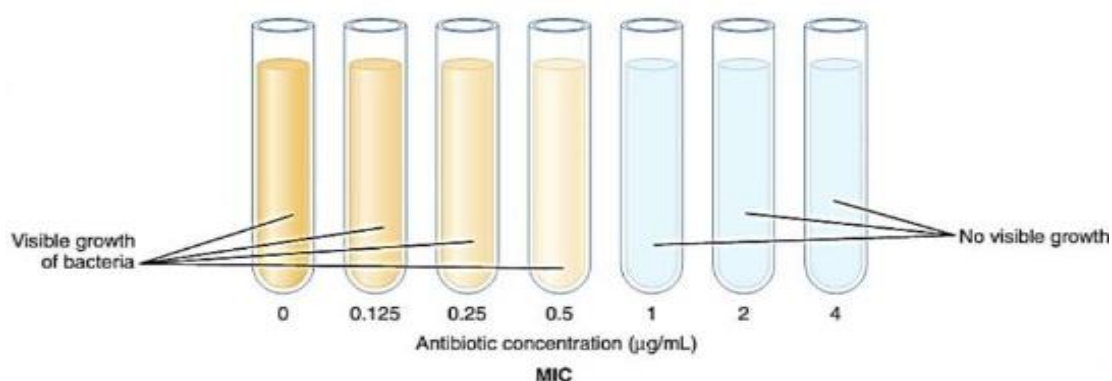


Figura 2.11 – Esquema representativo da determinação da concentração mínima inibitória, adaptado <https://www.slideshare.net/kyawsanlin25/terminologies-on-anti-infective-agents>, acessado a 14 setembro 2020.

## 2.6 Epigalocatequina-3-galato (EGCG)

Ao longo destes últimos anos com o aparecimento de microrganismos multi-resistentes, a OMS incitou a busca de novos compostos antimicrobianos naturais que possam ser usados contra esses microrganismos (2). Vários estudos tentaram encontrar novas abordagens focadas no uso de produtos ou compostos naturais com propriedades terapêuticas (11,19,20).

Uma dessas abordagens foi o uso do chá verde e o estudo das suas propriedades benéficas (21–23).

O chá verde é conhecido como uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. É produzido principalmente em países asiáticos a partir das folhas da planta *Camellia sinensis*. A sua composição química inclui, entre outros componentes os polifenóis (flavonóides e catequinas), responsáveis pelas propriedades benéficas. As quatro principais catequinas deste chá são: a *epicatequina* (EC), a *epicatequina-3-galato* (ECG), a *epigalocatequina* (EGC) e a *epigalocatequina-3-galato* (EGCG) (11,22,24,66).

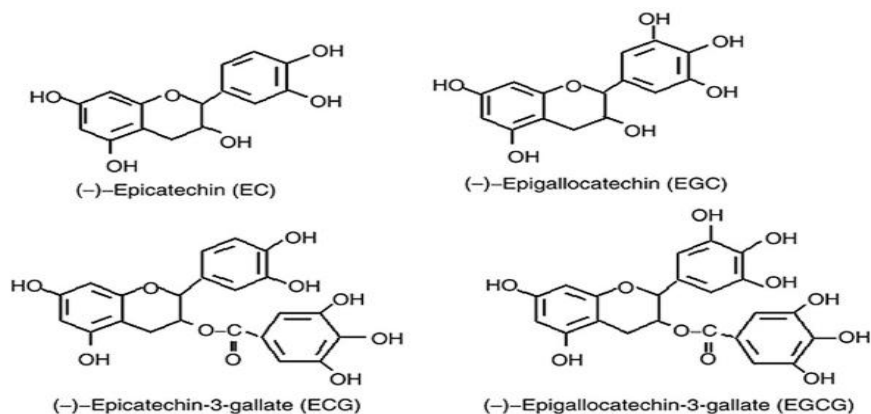


Figura 2.12 - Estrutura química das principais catequinas do chá verde, adaptado de (11)

A EGCG é a catequina mais abundante e com maior relevância do ponto de vista médico, apresentando um forte poder anti-inflamatório, anti-oxidante, anti-carcinogénico, elevado poder antimicrobiano (combatendo e prevenindo infeções), e demonstrando sinergismo com vários antibióticos (24,66,67).

Uma das suas propriedades é a capacidade de ligação à membrana celular incluindo a de bactérias, interferindo em vários processos, danificando a membrana, levando à lise da célula (10–13,24).

Esta capacidade, deve-se ao facto de a EGCG ser carregada negativamente ligando-se à membrana celular da bactéria que é carregada positivamente, impossibilitando a ligação da bactéria a células hospedeiras, assim como, a ligação a outras bactérias impedindo a formação de biofilme e libertação de toxinas (10,11,24).

Estudos reportaram que a concentração mínima inibitória (CMI) de EGCG estava abaixo de 100 µg/mL (11,68,69), sendo que CMI de EGCG contra *S. aureus* comprovadas em estudos varia entre 50 - 100 µg/ml (67,70).

O mecanismo de ação do EGCG contra *Staphylococcus*, foi amplamente investigado por Yam e os seus colaboradores, que demonstraram que extratos de chá verde conseguem reverter o fenótipo de resistência em estirpes de MRSA (27).

Um estudo realizado por Zhao e os seus colaboradores, refere que concentrações de 25µg/ml de EGCG conseguem reverter o fenómeno de resistência em estirpes de MRSA (71).

A EGCG provoca alterações na parede celular bacteriana, influenciando a síntese de PBP2 que conferem a resistência a β-lactâmicos (24,71).

### 2.6.1 Potencial sinérgico da EGCG

Sinérgismo é definido como a interação de duas ou mais substâncias ou outros agentes para produzir um efeito combinado maior do que a soma de seus efeitos separados, ou seja, quando existe uma ação potenciadora (72).

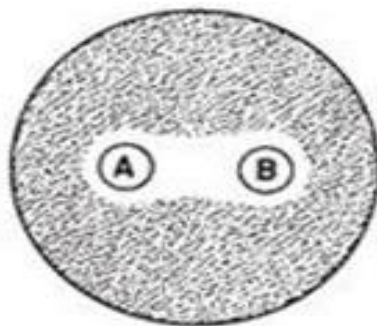


Figura 2.13 - Exemplo de sinérgismo, adaptado de (73)

Estudos anteriores demonstraram existir sinérgismo entre EGCG e diferentes antibióticos (11,24,68,74,75). Muitos destes estudos investigaram o eventual sinérgismo entre as catequinas do chá verde com β-lactâmicos e focaram o seu objetivo no *S. aureus*, em particular o MRSA. Estudos comprovaram que a EGCG provoca danos na parede celular bacteriana comprometendo a sua integridade. A

EGCG liga-se ao peptidoglicano sendo esta a principal razão do sinergismo entre EGCG e os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos contra MRSA (68,76).

*Roccaro et al.* comprovaram que as catequinas interagem sinergeticamente com a *tetraciclina* contra *S. aureus* (10,76).

Vários investigadores também demonstraram existir efeito sinérgico com *penicilina*, *oxacilina*, *ampicilina/sulbactam* e *imipenem* no MRSA (11,24,69,71,76).

Na tabela seguinte estão exemplos de sinergismo do chá verde com diferentes antibióticos (24).

Antimicrobial Action	Drug Synergism
Inhibit Cell Wall Synthesis	ampicillin
	ampicillin/sulbactam
	amoxicillin
	aztreonam
	cefalotin
	cefepime
	cefotaxime
	ceftazidime
	imipenem
	meropenem
	oxacillin
	penicillin
piperacillin	
Inhibit Protein Synthesis	amikacin
	azithromycin
	chloramphenicol
	doxycycline
	erythromycin
	gentamicin
	tetracycline
tobramycin	
Inhibit Nucleic Acid Synthesis	ciprofloxacin
	levofloxacin
	metronidazole
	nalidixic acid

Figura 2.14 – Exemplos de sinergismo do chá verde com diferentes antibióticos, adaptado de (24).

### 3. Objetivos

---

Face ao aumento de estirpes multi-resistentes, a busca constante de novos compostos antimicrobianos ou adjuvantes naturais tem vindo a aumentar.

Este estudo tem como objetivo geral avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* da EGCG na reversão do fenótipo de resistência, assim como verificar o potencial sinergismo com antibióticos com diferentes mecanismos de ação contra estirpes de *S. aureus* (MSSA e MRSA) isoladas de infeções hospitalares e da comunidade, reforçando a EGCG como composto natural com potencial antimicrobiano e / ou adjuvante terapêutico contra microrganismos resistentes a antibióticos.

Os objetivos específicos para este estudo são:

- Caracterizar a prevalência de *S. aureus* nas amostras recolhidas da comunidade;
- Analisar o perfil de suscetibilidade a antibióticos das estirpes isoladas da comunidade e estirpes isoladas de infeções hospitalares;
- Comprovar o sinergismo entre EGCG e estirpes com fenótipo de resistência em estirpes da comunidade e em estirpes de infeções hospitalares;
- Verificar se a co-exposição de EGCG potencia a ação dos antibióticos usados (*imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µ, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) tendo efeito sinergista;
- Observar se existem divergências no crescimento em estirpes de *S. aureus* da comunidade e hospitalares quando expostas a EGCG.



## 4. Materiais e métodos

---

### 4.1 Tipo de estudo e variáveis

Uma vez que este estudo tem como objetivo verificar o efeito antimicrobiano e o potencial sinergismo da EGCG com antibióticos com diferentes mecanismos de ação em estirpes recolhidas de amostras de infeções hospitalares e da comunidade, este estudo pode classificar-se como experimental, uma vez que as variáveis relacionadas com o objetivo de estudo são manipuladas tendo como finalidade testar as hipóteses propostas possibilitando a avaliação da relação entre causa e efeito (77).

Para este estudo, as hipóteses colocadas foram: 1) se a EGCG atua sinergeticamente com os antibióticos usados de modo a verificar a alteração do fenótipo de resistência; 2) se a EGCG potencia a ação dos antibióticos utilizados, ou seja, se observamos um aumento tamanho da zona de inibição quando expostas à EGCG; 3) observar diferenças de crescimento nas estirpes estudadas; 4) se existem diferenças entre as estirpes da flora comensal e as estirpes hospitalares.

Quanto às variáveis, podemos classificá-las como qualitativas ordinais (uso de EGCG em diferentes concentrações); qualitativa nominal (o uso de quatro antibióticos diferentes); qualitativas dicotómica nominal (se verificamos a reversão do fenótipo de resistência ou não); qualitativas tricotómicas (tempos de leituras – 18, 24 e 48h) e quantitativas contínuas (medição do tamanho da zona de inibição dos TSA) (77,78).

A revisão da literatura foi realizada utilizando a base de dados *PubMed*, pesquisando artigos no mínimo com 10 anos, usando as palavras chave como chá verde; sinergismo; *S. aureus*; MRSA; EGCG; resistência a antibióticos.

### 4.2 Amostra

Para este projeto foram recolhidas amostras de exsudados nasofaríngeo de indivíduos voluntários com idade igual ou superior a 18 anos sem patologias conhecidas associadas e sem a toma de medicação, particularmente antibióticos, nos 6 meses anteriores à colheita, com exposição ocupacional a serviços de saúde nomeadamente Hospitais e Centros de Saúde (n=38) após leitura e assinatura do consentimento informado (**apêndice I**), salvaguardando todas as questões éticas inerentes.

As estirpes provenientes de infeções hospitalares (n=32) foram obtidas após processamento, identificação e realização de teste sensibilidade a antibióticos, de amostras de infeções hospitalares, após autorização do Conselho de Administração,

Conselho de Ética para a Saúde e do Serviço de Patologia Clínica – seção de Microbiologia de um Hospital de Lisboa (**anexo I, II**).

### 4.3. Procedimentos laboratoriais

#### 4.3.1 Colheita de exsudado nasofaríngeo

A recolha de amostras da comunidade foi realizada a cada voluntário, após leitura e assinatura do consentimento informado, através de uma colheita de exsudado nasofaríngeo de acordo com as normas de colheita em microbiologia como ilustrado na **figura 4.1**.

Para a recolha do exsudado nasofaríngeo foi inserido uma zaragatoa estéril em ambas as narinas, rodando a zaragatoa contra a mucosa e ao longo do septo nasal. Colocar a zaragatoa no meio de transporte - meio de Stuart, e enviar o mais rapidamente possível ao laboratório (79). Todas as amostras foram codificadas, respeitando o anonimato de cada participante.

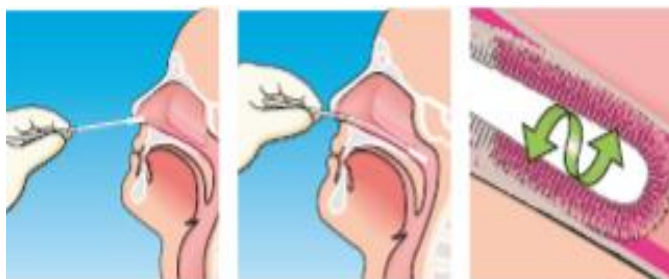


Figura 4.1 - Exemplo de colheita de exsudado nasofaríngeo, adaptado de Vancouver Coastal Health Influenza-Like Illness ( ILI ) Outbreak Specimen Collection 2017 (80).

#### 4.3.2 Identificação do *S. aureus*

As amostras recolhidas foram semeadas em gelose de Columbia agar com 5% de sangue de carneiro e em meio cromogénico de MRSA - CHROMID® MRSA da *Biomerieux*, e incubadas por 24 e 48 horas a 37°C.

Em gelose de sangue, após o período de incubação, as colónias foram avaliadas consoante as suas características culturais (colónias arredondadas de cor branca, acinzentadas ou ligeiramente amareladas com  $\beta$ -hemólise), e as colónias suspeitas foram reisoladas e incubadas durante 24 horas a 37°C para obtenção de cultura pura e jovem para identificação (**figura 4.2 A e B**).

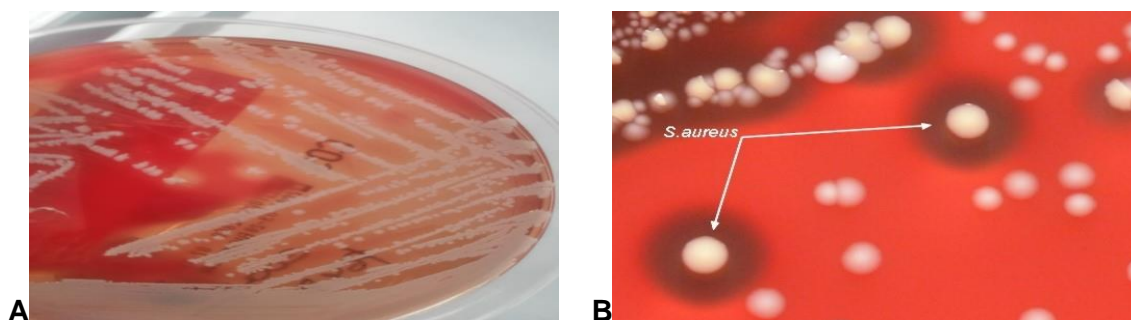


Figura 4.2 – Colônias suspeitas de *S. aureus* em gelose de Columbia agar. (A) Fotografia captada durante o projeto e (B) imagem retirada de [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)

O meio cromogênico de CHROMID® MRSA (figura 4.3) consiste num meio rico em nutrientes que combina diferentes peptonas. Além disso, contém um substrato cromogênico de  $\alpha$ -glicosidase e uma combinação de diversos antibióticos, incluindo a *cefotixina* que favorecem o crescimento de MRSA. A mistura seletiva inibe a maioria das bactérias não pertencentes ao género *Staphylococcus*, bem como as leveduras. Após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, a presença de pelo menos uma colônia verde típica é indicativo da presença de MRSA (81).

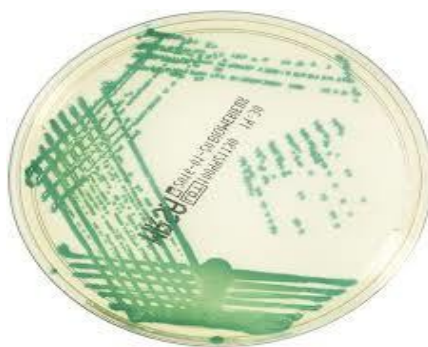


Figura 4.3 – Meio cromogênico CHROMID®MRSA da *Biomerieux*, retirado de <https://www.biomerieux-diagnostics.com>, aceso a 10 setembro 2020.

A identificação do *S. aureus* foi realizada através do teste bioquímico da catalase e do teste imunológico *Slidex Staph Kit* da *Biomerieux* (ref # 73115). Este, consiste num teste de aglutinação de partículas látex que permite a identificação simultânea do fator de afinidade ao fibrinogénio, da proteína A e dos polissacarídeos capsulares de *S. aureus*. Na presença de uma reação positiva observa-se a formação de agregados com as partículas látex, visíveis macroscopicamente, em menos de 30 segundos.

Perante uma reação negativa, a suspensão não irá apresentar agregados, mantendo um aspeto leitoso (**figura 4.4**).



Figura 4.4 – Exemplo de teste de aglutinação de partículas em latex, em que: A) Resultado positivo apresentando agregados visíveis macroscopicamente e B) Resultado negativo sem agregados, adaptado de <http://www.bionor.no/human.htm>, acedido a 8 outubro 2020.

Para a confirmação do fenótipo de resistência à meticilina, foi utilizado o teste imunológico, *MRSA - Detection Slidex Kit* da *Biomérieux* (ref#73117). Este teste consiste num teste de aglutinação de partículas de látex revestidas com anticorpos contra PBP2a. Se a reação for positiva observa-se a formação de agregados com as partículas de látex, visíveis macroscopicamente.

Como controlo positivo foram usadas estirpes de *S. aureus* previamente identificadas e fenotipadas no laboratório, e como controlo negativo a estirpe *ATCC 252923*.

#### 4.3.2.1 Teste Bioquímico da Catalase

O teste bioquímico da catalase permite distinguir bactérias do género *Staphylococcus* de bactérias do género *Streptococcus*. A enzima catalase converte o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. A liberação do oxigénio observa-se pela formação de bolhas (**figura 4.5**).

Para realizar o teste bioquímico da catalase, transfere-se com uma ança a colónia suspeita para uma lâmina de vidro. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 3%, e observar se existe ou não formação de bolhas (reação positiva).

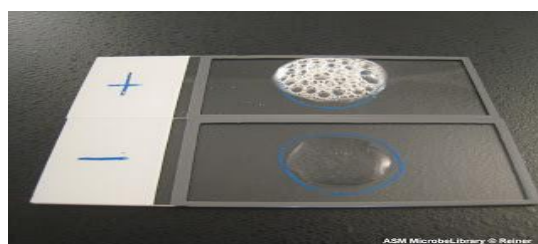


Figura 4.5 - Teste da catalase, retirada de <https://microbesinfo.com/2013/05/catalase-test-a-test-to-differentiate-staphylococcus-and-streptococcus/>, acedido a 7 outubro 2020.

### 4.3.3 Recolha de estirpes isoladas de infeções hospitalares

Após todas as autorizações necessárias de modo a assegurar todas as questões éticas inerentes ao estudo, foi realizada a recolha de estirpes de *S. aureus* incluindo MSSA (n=16) e MRSA (n=16) em amostras de infeções hospitalares, após identificação num laboratório de microbiologia de um hospital de Lisboa, através de métodos automatizados - VITEK MS e VITEK 2 - ambos da *Biomerieux* (figura 4.6). Todas as estirpes foram isoladas para análise posterior e foram codificadas, respeitando o anonimato de cada doente e foram armazenadas em glicerol 10% a -20°C.

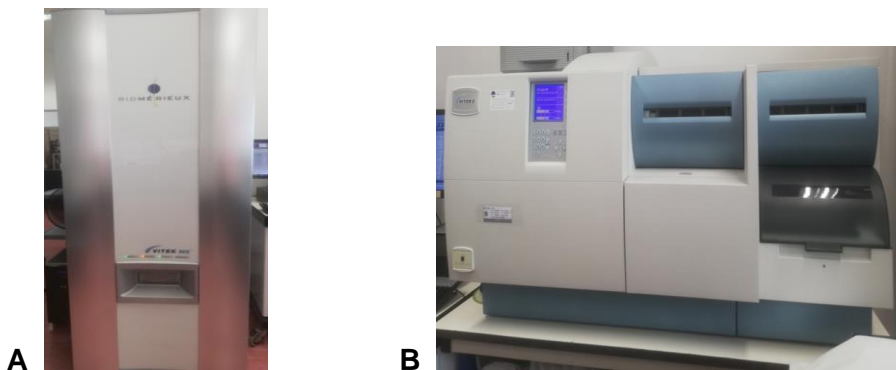


Figura 4.6 - VITEK MS (A) e VITEK 2 (B) ambos da Biomerieux. Fotografias captadas durante o projeto.

### 4.3.4 Determinação da CMI

A CMI para de estirpes de *S. aureus* isoladas de infeções hospitalares MSSA (n=16) e MRSA (n=16) e de *S.aureus* de estirpes isoladas da comunidade MSSA (n=7) e MRSA (n=9) foi determinada usando diferentes concentrações de EGCG.

Estas concentrações foram obtidas a partir de uma solução de trabalho inicial 0.5 mg/mL que foi preparada com 20 mL de Mueller Hinton Broth (MHB) à qual foram adicionados 10 mg de EGCG (E4143 Sigma). A partir dessa solução de trabalho foram feitas diluições de modo a obter quatro concentrações diferentes 25; 50; 100 e 250 µg/ml.

Em cada tubo com as diferentes diluições de EGCG foram inoculadas as estirpes a serem testadas em 1ml de MHB usando uma escala turbidimétrica de 0,5 *McFarland* (*McF*) medida no densitómetro da Biomérieux (DensiCHECK plus) de acordo com os protocolos CLSI número 8.2.1, onde está descrito a preparação do inóculo a partir do método de suspensão direto de colónias puras isoladas e o protocolo número10.3,

onde está descrito o procedimento para macrodiluição em tubo com MHB (64). Posteriormente foram colocados a incubar a 37°C. As leituras das densidades óticas foram realizadas às 18, 24 e 48 horas. Foi realizado o branco para todas as concentrações de EGCG e o valor da densidade ótica obtido foi subtraído a todas as amostras.

#### 4.3.5 Teste de avaliação de sensibilidade a antibióticos (TSA) em estirpes recolhidas da comunidade

As estirpes isoladas da flora comensal foram inoculadas em 1ml de MHB usando uma escala turbidimétrica de 0,5 *McF*.

O teste de sensibilidade a antibióticos foi avaliado através do método de difusão em disco, usando o meio de agar Mueller Hinton (MH) e discos de antibióticos de *amoxicilina* 25µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *imipenem* 10µg, de acordo com o protocolo número 5.1.2 a 5.4 CLSI (82).

As placas inoculadas foram a incubar durante 24 e 48 horas a 37°C. Foram feitas medições das zonas de inibição (halos), e a suscetibilidade, sensível ou resistente, foi feita de acordo com os valores da tabela EUCAST v10.0 válida a partir de 01-01-2020 (83).

Tabela 4.1 – Intervalos da zona de inibição para determinar sensibilidades ou resistências a antibióticos, de acordo com valores da tabela EUCAST v10.0 válida a partir de 01-01-2020 (83)

Antibióticos	Zona inibição em milímetros (mm)	
	Sensível	Resistente
Imipenem 10 µg*	≥ 22	< 22
Tetraciclina 30 µg	≥ 22	< 19
Gentamicina 30 µg	≥ 18	< 18
Amoxicilina 25 µg*	≥ 22	< 22

\* Os valores dos intervalos de medição das zonas de inibição para o *imipenem* e *amoxicilina* foram inferidos pelos valores da *cefotaxima*, de acordo com indicações na tabela EUCAST v10.0 válida a partir de 01-01-2020.

### 4.3.6 Teste sensibilidade a antibióticos (TSA) em estirpes recolhidas de infeções hospitalares

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado após identificação e isolamentos de estirpes de *S. aureus* de amostras de infeções hospitalares, através de métodos automatizados (VITEK MS e VITEK2). Para o antibiograma no VITEK2 foi utilizada a carta AST648 (ref # 420857) (figura 4.7).



Figura 4.7 - Carta P-648 utilizada para teste de sensibilidade a antibióticos (VITEK2).  
Fotografia captada durante o projeto.

### 4.3.7 Avaliação do potencial sinergismo da EGCG

Para a avaliação do potencial sinergismo do EGCG (E4143 Sigma), as estirpes de *S. aureus* de estirpes isoladas da flora comensal e de infeções hospitalares foram inoculadas em 1ml de MHB, usando uma escala turbidimétrica de 0,5 McF de acordo com o protocolo número 8.2.1 CLSI (64) nas concentrações finais de EGCG a 25; 50; 100 e 250 µg/ml.

As estirpes foram inoculadas em MH, onde foram colocados os discos de antibióticos a serem testados (*amoxicilina* 25µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *imipenem* 10µg) de acordo com o protocolo número 5.1.2 a 5.4 CLSI (82). Após incubação a 37°C, foram feitas medições das zonas de inibição (halos) com o auxílio de uma régua e foi realizada a avaliação das suscetibilidades às 18, 24 e 48 horas de acordo com os valores da tabela EUCAST v10.0 válida a partir de 01-01-2020 (83).

## 4.4 Análise estatística de inferência

As diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição e o tamanho das zonas de inibição de estirpes de MSSA e MRSA recolhidas da comunidade e de

infecções hospitalares, foram avaliadas usando o teste *t-student* emparelhado, após a verificação da normalidade da distribuição das variáveis em estudo, através dos testes da normalidade, designadamente o de *Shapiro-Wilk*.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos, com atribuição de significância estatística ao valor de  $p > 0,05$  - não significante; 0,01 a 0,05 - significante; 0,001 a 0,01 - muito significante e  $p < 0,001$  - extremamente significante.

O tratamento estatístico e os gráficos foram realizados no *Microsoft Excel*®.

## 4.5 Ética

Este trabalho está inserido num projeto do Instituto Politécnico de Lisboa, tendo sido aprovado no Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde ref: CE-ESTeSL-Nº18-2019. Este projeto foi também aprovado pelo Conselho de Ética para a Saúde e do Conselho de Administração do Hospital, de modo a garantir a salvaguarda de todas as questões éticas inerentes (**anexo I, II e III**).

Sendo um projeto em que foram utilizadas amostras biológicas de indivíduos para fins estritamente investigacionais, existiu o compromisso de ter em consideração o direito à confidencialidade e anonimato dos participantes garantindo os princípios de ética de acordo com a Declaração de Helsínquia e Convenção de Oviedo (84) e em acordo com a lei Portuguesa nº58/2019 de 8 de agosto sobre a proteção de dados (85), mediante leitura e assinatura de um consentimento informado que se encontra no **apêndice I**.

Todas as amostras recolhidas foram identificadas com um número/código previamente estabelecido, não existindo qualquer outra informação acerca do indivíduo.

## 4.6 Financiamento / Subsídios

Este projeto foi realizado em colaboração com a Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa e o Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia H&TRC.

## 5. Resultados

---

Este estudo foi separado em duas etapas distintas:

A primeira etapa em que foi realizada a colheita de amostras de voluntários com exposição ocupacional a ambiente de cuidados de saúde (n=38), das quais foram isoladas e identificadas estirpes de *S. aureus* (MSSA n=7 e MRSA n=9) e realizado o estudo do efeito da EGCG e a avaliação do potencial sinergismo com diferentes antibióticos.

E uma segunda etapa, em que se procedeu à recolha de amostras de estirpes de MSSA (n=16) e MRSA (n=16) em amostras de infeções hospitalares, já caracterizadas num laboratório de microbiologia de um hospital de Lisboa, para avaliar o efeito e potencial sinergismo da EGCG com diferentes antibióticos.

Em ambas as etapas anteriormente descritas, primeiramente verificamos se a EGCG atua sinergeticamente com os diferentes antibióticos usados permitindo avaliar a alteração do fenótipo, se o reverte para sensível ou se mantém a resistência. Posteriormente, foi realizada a co-exposição da EGCG com os diferentes antibióticos, de forma a verificar a existência ou não de sinergismo com os antibióticos, através da medição da zona de inibição o que nos permite avaliar o comportamento das estirpes de MSSA e MRSA hospitalares e da comunidade ao longo do tempo (18, 24 e 48h).

Por último, comparamos o crescimento nas estirpes de MSSA e MRSA da comunidade, o crescimento nas estirpes de MSSA e MRSA hospitalares, e comparamos o crescimento entre as estirpes da comunidade e hospitalares de forma a observar se existem diferenças significativas entre elas quando expostas a EGCG nas diferentes concentrações.

## 5.1 Prevalência de *S. aureus* em amostras da comunidade

A prevalência de *S. aureus* na população estudada em amostras recolhidas da comunidade foi de 42,1% em que 18,4% são MSSA e 23,7% MRSA, como se pode observar na **tabela 5.1**.

Tabela 5.1 - Prevalência de *S.aureus* em voluntários com exposição ocupacional, em que MSSA (*S. aureus* sensível à meticilina) e MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina).

Prevalência de <i>S. aureus</i> em amostras recolhidas da comunidade ( <i>S. aureus</i> 16/38 – 42,1%)	
MSSA	MRSA
7/38 – 18,4%	9/38 – 23,7%

## 5.2 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *S. aureus* isoladas da comunidade

Para a fenotipagem no que se refere a resistência a antibióticos das estirpes provenientes das amostras recolhidas em voluntários com exposição ocupacional, foi realizado a avaliação da sensibilidade aos antibióticos *imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg.

Após incubação (24h a 37°C), para cada estirpe foi feita a medição das zonas de inibição dos antibióticos, e a caracterização de sensível (S) e resistente (R) foi feito de acordo com os valores estabelecidos pela EUCAST. Os resultados obtidos estão registados na **tabela 5.2**. Observamos que todas as estirpes são sensíveis à *tetraciclina* e à *gentamicina*. As estirpes de MSSA codificadas como *CC4*, *MB1*, *MB6*, *MB10* e as estirpes de MRSA codificadas com *MB2*, *MB4*, *VFXB14*, *VFXB15*, *VFXB16* são resistentes à *amoxicilina*. A estirpe codificada *MB12* é resistente ao *imipenem* e à *amoxicilina*.

Tabela 5.2 - Antibiograma de estirpes de MSSA e MRSA isoladas da flora comensal de voluntários com *imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg, em que S-sensível e R-resistente. A cor vermelha indica as estirpes que apresentaram fenótipo de resistência aos antibióticos testados.

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Estirpes	Imip 10µg	Tetra 30µg	Genta 30µg	Amox 25µg
	CC3	S	S	S	S
<b>M</b>	CC4	S	S	S	R
<b>S</b>	MB1	S	S	S	R
<b>S</b>	MB6	S	S	S	R
<b>A</b>	MB10	S	S	S	R
	MB17	S	S	S	S
	5-7S	S	S	S	S
	MB2	S	S	S	R
	MB4	S	S	S	R
<b>M</b>	MB5	S	S	S	S
<b>R</b>	MB12	R	S	S	R
<b>S</b>	1-2S	S	S	S	S
<b>A</b>	VFXB7	S	S	S	S
	VFXB14	S	S	S	R
	VFXB15	S	S	S	R
	VFXB16	S	S	S	R

### 5.3 Sinergismo entre EGCG e estirpes com fenótipo de resistência em amostras recolhidas da comunidade

De forma a avaliar o potencial sinergismo entre a EGCG e os diferentes antibióticos testados, estirpes isoladas da comunidade foram inoculadas nas diferentes concentrações de EGCG (250 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml e 25 µg/ml) e foram realizados testes de sensibilidade aos antibióticos testados de modo a verificar a existência de sinergismo com os antibióticos usados.

Relativamente aos resultados obtidos com o *imipenem*, os quais se encontram registados na **tabela 5.3**, podemos observar que todas as estirpes apresentam fenótipo sensível, exceto a estirpe de MRSA codificada como *MB12*, que apresenta fenótipo de resistência. Quando exposta às diferentes concentrações de EGCG,

observou-se que nesta estirpe o fenótipo de resistência passou de resistente a sensível, ou seja, o EGCG potencializou a ação do *imipenem* onde se observou a reversão de fenótipo.

Tabela 5.3 – Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com *imipenem* 10µg, em que S-sensível e R-resistente.

A cor vermelha indica a estirpe com fenótipo de resistência, e a cor verde indica a reversão do fenótipo de resistência ao *imipenem* com as diferentes concentrações de EGCG.

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Estirpes	Imip 10µg	Imip + 250 µg/ml EGCG	Imip + 100 µg/ml EGCG	Imip + 50 µg/ml EGCG	Imip + 25 µg/ml EGCG
	CC3	S	S	S	S	S
<b>M</b>	CC4	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB1	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB6	S	S	S	S	S
<b>A</b>	MB10	S	S	S	S	S
	MB17	S	S	S	S	S
	5-7S	S	S	S	S	S
	MB2	S	S	S	S	S
	MB4	S	S	S	S	S
<b>M</b>	MB5	S	S	S	S	S
<b>R</b>	MB12	R	S	S	S	S
<b>S</b>	1-2S	S	S	S	S	S
<b>A</b>	VFXB7	S	S	S	S	S
	VFXB14	S	S	S	S	S
	VFXB15	S	S	S	S	S
	VFXB16	S	S	S	S	S

Relativamente à exposição com a *amoxicilina* na **tabela 5.4**, estão registradas as estirpes de MSSA e MRSA da comunidade expostas às diferentes concentrações de EGCG com a *amoxicilina* 25µg. As estirpes codificadas como CC3, MB17, 5-7S MB5, 1-2S e VFXB7 apresentam fenótipo de sensível (S).

As estirpes codificadas como CC4, MB1, MB6, MB10, MB2, MB4, MB12, VFXB14 VFXB15, VFXB16 apresentavam fenótipo de resistência (R).

Ao analisarmos as estirpes codificadas como *MB6*, *MB2*, *MB4*, quando expostas à EGCG nas diferentes concentrações o fenótipo de resistência passou a ser sensível, ou seja, a EGCG potenciou a ação da *amoxicilina* nestas estirpes. As estirpes codificadas como *MB1* e *VFXB16* só demonstraram a reversão do fenótipo de resistência para sensível nas concentrações de EGCG a 250µg/ml e a 100µg/ml, demonstrando sinergismo. Nas concentrações de 50µg/ml e 25µg/ml o fenótipo mantêm-se resistente. As estirpes codificadas como *MB10*, *MB12*, *VFXB14* E *VFXB15* mantiveram o fenótipo de resistência, ou seja, nestas estirpes não se verificou sinergismo entre a EGCG com a *amoxicilina*.

Em relação à exposição com *tetraciclina* 30µg e *gentamicina* 30µg, todas as estirpes de MSSA e MRSA da comunidade apresentavam fenótipo de sensível.

Tabela 5.4 - Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com *amoxicilina* 25µg, em que S-sensível e R-resistente.

A cor vermelha indica as estirpes que apresentaram fenótipo de resistência. A cor verde nas linhas indica as estirpes que apresentaram reversão do fenótipo de resistência à *amoxicilina* com as diferentes concentrações de EGCG.

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Estirpes	Amox 25µg	Amox + 250 µg/ml EGCG	Amox + 100 µg/ml EGCG	Amox + 50 µg/ml EGCG	Amox + 25 µg/ml EGCG
	CC3	S	S	S	S	S
<b>M</b>	CC4	R	S	S	S	R
<b>S</b>	MB1	R	S	S	R	R
<b>S</b>	MB6	R	S	S	S	S
<b>A</b>	MB10	R	R	R	R	R
	MB17	S	S	S	S	S
	5-7S	S	S	S	S	S
	MB2	R	S	S	S	S
	MB4	R	S	S	S	S
<b>M</b>	MB5	S	S	S	S	S
<b>R</b>	MB12	R	R	R	R	R
<b>S</b>	1-2S	S	S	S	S	S
<b>A</b>	VFXB7	S	S	S	S	S
	VFXB14	R	R	R	R	R
	VFXB15	R	R	R	R	R
	VFXB16	R	S	S	R	R

## 5.4 Identificação e teste de sensibilidade a antibióticos de estirpes de *S. aureus* isoladas de infeções hospitalares

A fenotipagem no que se refere a resistência a antibióticos das estirpes de MSSA recolhidas de infeções hospitalares, após a sua identificação e teste de sensibilidade a antibióticos por métodos automatizados, está registada na **tabela 5.5** onde estão descritos os locais da colheita da amostra biológica, assim como as sensibilidades e resistências aos antibióticos usados na carta do VITEK2 – AST P648, das estirpes isoladas nas respetivas amostras. Todas as amostras foram codificadas de modo a manter o anonimato de cada doente.

As estirpes isoladas e identificadas com fenótipo de resistência à meticilina sensível foram recolhidas de infeções hospitalares como: exsudados purulentos (colhidos por zaragatoa ou aspirados); exsudados de feridas operatórias; expetorações; urinas; exsudado superficial (zaragatoa e aspirado); líquido diálise; biópsias/fragmentos de tecido; hemocultura.

Para o teste de sensibilidade aos antibióticos, os antibióticos usados foram: *Penicilina*; *Tetraciclina*; *Trimethoprim/Sulfametoxazol*; *Teicoplanina*; *Linezolid*; *Mupirocina*; *Ácido Fusídico*; *Rifampicina*; *Vancomicina*; *Oxacilina*; *Gentamicina*; *Eritromicina*; *Moxifloxacina*; *Levofloxacina*; *Cefoxitina*; *Daptomicina*; *Clindamicina*.

Tabela 5.5 - Sensibilidades e Resistências Screen à cefoxitina de estirpes de MSSA isoladas de infeções hospitalares a antibióticos como Oxac (*Oxacillina*); Genta (*Gentamicina*); Eritro (*Erythromicina*); Clinda (*Clindamicina*); Tetra (*Tetraciclina*); Trimeth/Sulfam (*Trimethoprim / Sulfamethoxazole*); Penic (*Penicillina*); Teicop (*Teicoplanina*); Moxiflox (*Moxifloxacina*); Levof (*Levofloxacina*); Ac. Fus (Ácido Fusídico); Vanco (*Vancomicina*); Rinfamp (*Rifampicina*); Moxif (*Moxifloxacina*); Linez (*Linezolid*); Mupic (*Mupirocina*) e Daptom (*Daptomicina*).

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Amostra biológica	Sensível	Resistente	Screen cefoxitina
	<b>MS1:</b> Exs. Purulento úlcera pé direito	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Daptom;Moxif;Levof;Vanco;Linez;Mupic;Ac.Fus; Rifamp	Penic;Teicop	Negativo
	<b>MS2:</b> Expetoração	Oxac;Genta;Clinda;Levoflox;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Eritro;Moxif;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic	Negativo
	<b>MS3:</b> Exs.Purulento anca esquerda	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Moxif;Levof;Vanco;Linez;Mupic;Ac,Fus; Rifamp	Penic;Teicop	Negativo

	<b>MS4:</b> Expetoração	Oxac;Genta;Clinda;Levoflox;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Eritro;Moxif;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penicilina	Negativo
<b>M</b>	<b>MS5:</b> Hemocultura	Oxac;Genta;Clinda;Trimeth/Sulfam;Penic;Tetra;Penic;Dapto;Eritro;Moxif;Levof;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	-	Negativo
<b>S</b>	<b>MS6:</b> Exs.Purulento pé esquerdo	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Penic;Dapto;Moxif;Levo;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	-	Negativo
<b>S</b>	<b>MS7:</b> Expetoração	Oxac;Genta;Levof;Tetra;Trimeth/Sulfam;Penic;Dapto;Moxif;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Eritro;Clinda	Negativo
<b>A</b>	<b>MS8:</b> Exs. ferida op.- aspirado mama	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Moxif;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic	Negativo
	<b>MS9:</b> Urina	Oxac;Genta;Clinda;Trimeth/Sulfam;Tetra;Dapto;Eritro;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Moxif;Levoflox	Negativo
	<b>MS10:</b> Exs.Superficial antebraço	Penic;Oxac;Genta;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Eritro;Moxif;Levof;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	-	Negativo
	<b>MS11:</b> Expetoração	Oxac;Genta;Clinda;Trimeth/Sulfam;Dapto;Moxif;Levof;Vanco;Linez;Mupic;Tetra;Ac.Fus;Rifamp;	Penic, Eritro;Teico	Negativo
	<b>MS12:</b> Expetoração	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Levof;Tetra Trimeth/Sulfam;Dapto;Moxif;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic	Negativo
	<b>MS13:</b> Expetoração	Oxac;Clinda;Levoflox;Tetra;Trimeth/Sulfam, Penic;Dapto;Moxif;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Genta; Eritro	Negativo
	<b>MS14:</b> Líquido de diálise	Oxac;Genta;Eritro;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Moxif;Levof;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Rifamp	Penic;Áci.Fus	Negativo
	<b>MS15:</b> Urina	Oxac;Genta;Trimeth/Sulfam;Tetra;Dapto;Eritro;Clinda;Moxif;Levof;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic	Negativo
	<b>MS16:</b> Exs.ferida operatória – zaragatoa ferida lombar	Oxac;Genta;Clinda;Tetra;Trimeth/Sulfam;Dapto;Eritro;Moxif;Levof;Vanco;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic	Negativo

A fenotipagem no que se refere a resistência a antibióticos das estirpes de MRSA recolhidas de infecções hospitalares, após a sua identificação e teste de sensibilidade a antibióticos por métodos automatizados, está registada na **tabela 5.6** onde estão

descritos os locais da colheita (amostra biológica), assim como as sensibilidades e resistências aos antibióticos usados na carta do VITEK2 – AST P648 das estirpes isoladas nas respectivas amostras. Todas as amostras foram codificadas de modo a manter o anonimato de cada doente.

As estirpes isoladas e identificadas com fenótipo de resistência à metilina resistente foram recolhidas de infeções hospitalares como: exsudados purulentos (colhidos por zaragatoa ou aspirados); exsudados de feridas operatórias; expetorações; lavado bronco-alveolar; exsudado superficial (zaragatoa e aspirado); biópsias/fragmentos de tecido; hemocultura catéter. Para o teste de sensibilidade aos antibióticos, os antibióticos usados foram: *Penicilina*; *Tetraciclina*; *Trimethoprim/Sulfametoxazol*; *Teicoplanina*; *Linezolid*; *Mupirocina*; *Ácido Fusídico*; *Rifampicina*; *Vancomicina*; *Oxacilina*; *Gentamicina*; *Eritromicina*; *Moxifloxacina*; *Levofloxacina*; *Cefoxitina*; *Daptomicina*; *Clindamicina*.

Tabela 5.6 – Sensibilidades e Resistências e Screen à cefoxitina de estirpes de MRSA isoladas de infeções hospitalares a antibióticos como Oxac (*Oxacillina*); Genta (*Gentamicina*); Eritro (*Erythromicina*); Clinda (*Clindamicina*); Tetra (*Tetraciclina*); Trimeth/Sulfam (*Trimethoprim / Sulfamethoxazole*); Penic (*Penicillina*); Teico (*Teicoplanina*); Moxif (*Moxifloxacina*); Levof (*Levofloxacina*); Ac. Fus (Ácido Fusídico); Vanco (*Vancomicina*); Rinfamp (*Rifampicina*); Moxif (*Moxifloxacina*); Linez (*Linezolid*); Mupic (*Mupirocina*) e Daptom (*Daptomicina*).

Fenótipo de Resistência à Metilina	Amostra biológica	Sensível	Resistente	Screen cefoxitina
	MR1: Exs. Purulento de ferida do dorso da mão	Genta; Trimeth/Sulfam; Vanco; Tetra; Dapt; Teico; Linez; Mupic; Ac. Fus; Rifamp	Penic; Oxac; Eritro; Clinda; Moxif; Levoflox	Positivo
	MR2: Exs. Purulento úlcera pé	Genta; Eritro; Clinda; Tetra; Trimeth/Sulfam; Vanco; Dapto; Moxif; Levof; Teico; Linez; Mupic; Rifamp	Penic; Oxac; Ác. fusídico	Positivo
	MR3: Expetoração	Tetra; levof; Vanco; Dapto; Moxif; Teico; Linez; Mupic; Ac. Fus; Rifamp	Penic; Oxac; Genta; Eritro; Clinda; Trimeth/Sulfam	Positivo
	MR4: Lavado broncoalveolar	Tetra; Vanco; Dapto; Moxif; Levof; Teico; Linez; Mupic; Ac. Fus; Rifamp	Penic; Oxac; Genta; Eritro; Clinda; Trimeth/Sulfam	Positivo
	MR5: Hemocultura	Genta; Clinda; Vanco; Tetra; Dapto; Eritro; Moxif; Levof; Trimeth/Sulfam; Teico; Linez; Mupic; Ac. Fus; Rifamp	Penic; Oxaci	Positivo
M	MR6: Exs. Purulento – pé	Genta; Tetra; Vanco; Dapto; Trimeth/Sulfam; Teico; Linez; Mupic; Ac. Fus; Rifamp	Penic; Oxac; Eritro; Clinda; Moxif; Levoflox	Positivo
R	MR7: Biópsia úlcera de pressão	Genta; Tetra; Dapto; Teico; Trimeth/Sulfam; Vanco;	Penic; Oxac; Eritro; Clinda;	Positivo

		Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Moxiflox;Levoflox	
<b>S</b>	<b>MR8:</b> Exs.Purulento zaragatoa – perna	Genta;Tetra;Dapto;Teico; Trimeth/Sulfam;Vanco;Linez;Mupic;Rifamp	Penic;Oxac;Eritro; Clinda; Moxiflox;Levoflox; Ac.Fus	Positivo
<b>A</b>	<b>MR9:</b> Hemocultura	Genta;Vanco;Tetra;Dapto; Teico;Trimeth/Sulfam;Linez Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Oxac;Eritro; Clinda; Moxiflox;Levoflox	Positivo
	<b>MR10:</b> Biópsia/fragmento de tecido - amputação	Genta;Tetra;Trimeth/Sulfam;Vanco;Dapto;Teico;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp;	Penic;Oxac;Eritro; Clinda; Moxiflox;Levoflox	Positivo
	<b>MR11:</b> Hemocultura-catéter	Genta;Clinda;Vanco;Tetra; Dapto;Eritro; Trimeth/Sulfam; Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Oxac;Moxif; Levof;	Positivo
	<b>MR12:</b> Exs.Purulento aspirado-hérnia inguino-escrotal	Genta;Tetra; Vanco;Teico; Trimeth/Sulfam;Dapto;Mupic; Ac.Fus; Rifamp	Penic;Oxac;Eritro; Clinda; Moxif;Levoflox	Positivo
	<b>MR13:</b> Exs.Purulento zaragatoa – pele queimada	Genta;Clinda;Tetra;Dapto; Trimeth/Sulfam;Vanco;Eritro;Moxif;Levof;Teico;Linez; Mupic;Rifamp	Penic;Oxac; Ac.Fusi	Positivo
	<b>MR14:</b> Exs.ferida operatória - matricectomia parcial dedo do pé	Genta;Clinda;Tetra;Vanco; Dapto;Eritro;Moxif;Levof;Teico;Trimeth/Sulfam;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Oxac	Positivo
	<b>MR15:</b> Hemocultura	Vanco;Tetra;Dapto;Teico; Trimeth/Sulfam;Linez;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Oxac;Genta; Eritro; Clinda;Moxiflox;Levoflox	Positivo
	<b>MR16:</b> Hemocultura	Genta;Vanco;Tetra;Dapto; Trimeth/Sulfam;Rifam;Linez;Teico;Mupic;Ac.Fus;Rifamp	Penic;Oxac;Eritro; Clinda; Moxiflox;Levof	Positivo

## 5.5 Sinergismo entre EGCG e estirpes com fenótipos de resistência em amostras de infecções hospitalares

Para avaliar o potencial sinergismo entre a EGCG e os diferentes antibióticos testados, estirpes hospitalares, foram inoculadas nas diferentes concentrações de EGCG (250; 100; 50 e 25 µg/ml) e foram realizados testes de sensibilidade aos antibióticos testados de modo a verificar a existência de sinergismo com os antibióticos usados.

Relativamente aos resultados obtidos para avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a *amoxicilina* 25µg, observamos **tabela 5.7** que as estirpes codificadas como *MS2* e *MS12*, apresentavam um fenótipo de resistência, mas quando expostas a EGCG em concentrações de 250µg/ml, 100µg/ml e 50µg/ml reverteram o fenótipo para sensível. Na concentração de EGCG 25µg/ml o

fenótipo manteve-se resistente. As estirpes codificadas como *MS1*, *MS3*, *MS4*, *MS8*, *MS9*, *MS11*, *MS14*, *MS15*, e *MS16* mantiveram o fenótipo de resistência, ou seja, não se observou sinergismo entre a EGCG com a *amoxicilina* nestas estirpes.

Tabela 5.7 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a *amoxicilina* 25µg em estirpes de MSSA de infecções hospitalares, em que S-sensível e R-resistente. A cor verde indica as estirpes que apresentaram alteração do fenótipo de resistência para sensível à *amoxicilina* e que sofreram alterações com as diferentes concentrações de EGCG. A cor vermelha indica fenótipo de resistência.

Fenótipo de Resistencia à Meticilina	Amostra biológica	Amox 25µg	Amox + 250 µg/ml EGCG	Amox + 100 µg/ml EGCG	Amox + 50 µg/ml EGCG	Amox + 25 µg/ml EGCG
	<b>MS1:</b> Exs.Purulento ulcera pé	R	R	R	R	R
	<b>MS2:</b> Expectoração	R	S	S	S	R
	<b>MS3:</b> Exs.Purulento anca	R	R	R	R	R
	<b>MS4:</b> Expectoração	R	R	R	R	R
	<b>MS5:</b> Hemocultura	S	S	S	S	S
	<b>MS6:</b> Exs.Purulento pé	S	S	S	S	S
<b>M</b>	<b>MS7:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
<b>S</b>	<b>MS8:</b> Exs.Ferida operatória - Mama	R	R	R	R	R
<b>S</b>	<b>MS9:</b> Urina	R	R	R	R	R
<b>A</b>	<b>MS10:</b> Exs. Superficial aspirado Antebraço	S	S	S	S	S
	<b>MS11:</b> Expectoração	R	R	R	R	R
	<b>MS12:</b> Expectoração	R	S	S	S	R
	<b>MS13:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
	<b>MS14:</b> Liquido Diálise	R	R	R	R	R
	<b>MS15:</b> Urina	R	R	R	R	R
	<b>MS16:</b> Exs.Ferida oper. - Lombar	R	R	R	R	R

Relativamente às estirpes de MRSA, todas as estirpes mantiveram o fenótipo de resistência quando expostas ao EGCG nas diferentes concentrações.

Verificamos então, que para as estirpes de MRSA hospitalares não se verifica sinergismo entre a *amoxicilina* 25µg e a EGCG.

Na avaliação do potencial sinergismo de EGCG com a *gentamicina* 30µg em estirpes de MSSA, **tabela 5.8**, observamos que para a estirpe codificada com *MS13* apresenta

fenótipo de resistência. Quando exposta à EGCG nas diferentes concentrações mantém a resistência, o que significa que a EGCG não teve efeito sinérgico com a *gentamicina* 30µg para esta estirpe. Todas as outras amostras de MSSA hospitalares apresentavam fenótipo de sensível.

Tabela 5.8 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a *gentamicina* 30µg, em que S-sensível e R-resistente em estirpes de MSSA hospitalares.

A linha a vermelho indica a estirpe que apresentava fenótipo de resistência à *gentamicina* e onde não se verificaram alterações com as diferentes concentrações de EGCG.

Fenótipo de Resistencia à Meticilina	Amostra biológica	Genta 30µg	Genta + 250 µg/ml EGCG	Genta + 100µg/ml EGCG	Genta + 50µg/ml EGCG	Genta + 25 µg/ml EGCG
	<b>MS1:</b> Exs.Purulento ulcera pé	S	S	S	S	S
	<b>MS2:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
	<b>MS3:</b> Exs.Purulento anca	S	S	S	S	S
	<b>MS4:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
	<b>MS5:</b> Hemocultura	S	S	S	S	S
	<b>MS6:</b> Exs.Purulento pé	S	S	S	S	S
<b>M</b>	<b>MS7:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
<b>S</b>	<b>MS8:</b> Exs.Ferida operatória - Mama	S	S	S	S	S
<b>S</b>	<b>MS9:</b> Urina	S	S	S	S	S
<b>A</b>	<b>MS10:</b> Exs. Superficial aspirado Antebraço	S	S	S	S	S
	<b>MS11:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
	<b>MS12:</b> Expectoração	S	S	S	S	S
	<b>MS13:</b> Expectoração	R	R	R	R	R
	<b>MS14:</b> Liquido Diálise	S	S	S	S	S
	<b>MS15:</b> Urina	S	S	S	S	S
	<b>MS16:</b> Exs.Ferida oper. - Lombar	S	S	S	S	S

Para as estirpes de MRSA hospitalares, na tabela **tabela 5.9** observamos que as estirpes codificadas como *MR3*, *MR4* que apresentavam inicialmente fenótipo de resistência à *gentamicina* 30µg, depois de expostas às diferentes concentrações de EGCG verificou-se a reversão do fenótipo de resistência e passaram a ser sensíveis. Verificamos então sinergismo entre a EGCG com a *gentamicina*.

A estirpe codificada como *MR15* que apresentava resistência à *gentamicina*, em concentrações de 250µg/m e 100µg/ml de EGCG verificou-se uma reversão do

fenótipo de resistência, tornando-se sensíveis. Ou seja, o EGCG em concentrações menos diluídas teve efeito sinérgico com a *gentamicina* com estas estirpes. Por outro lado, em concentrações de EGCG de 50µg/ml e 25µg/ml o fenótipo manteve-se resistente.

Tabela 5.9 - Avaliação de potencial sinérgico de EGCG em diferentes concentrações com a *gentamicina* 30µg, em que S-sensível e R-resistente em estirpes de MRSA hospitalares.

A cor vermelha indica as estirpes com fenótipo de resistência à *gentamicina* 30µg e a cor verde onde se verificaram alterações com as diferentes concentrações de EGCG.

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Amostra biológica	GENTA 30µg	GENTA + 250 µg/ml EGCG	GENTA + 100 µg/ml EGCG	GENTA + 50 µg/ml EGCG	GENTA + 25 µg/ml EGCG
	MR1:Exs.Purulento de ferida da mão	S	S	S	S	S
	MR2:Exs.Purulento de ulcera pé	R	S	S	S	S
	MR3:Expectoração	R	S	S	S	S
	MR4:Lavado broncoalveolar	S	S	S	S	S
	MR5:Hemocultura	S	S	S	S	S
	MR6:Exs.purulento - pé	S	S	S	S	S
M	MR7:Biópsia úlcera pressão	S	S	S	S	S
R	MR8:Exs. Purulento	S	S	S	S	S
S	MR9:Hemocultura	S	S	S	S	S
A	MR10:Biópsia/fragmento tecido - amputação	S	S	S	S	S
	MR11:Hemocultura - catéter	S	S	S	S	S
	MR12:Exs.purulento aspirado - hérnia inguino-escrotal	S	S	S	S	S
	MR13:Exs.purulento zaragatoa - pele queimada	S	S	S	S	S
	MR14:Exs. Ferida operatória	S	S	S	S	S
	MR15:Hemocultura	R	S	S	R	R
	MR16:Hemocultura	S	S	S	S	S

No que respeita à exposição com a *tetraciclina* 30µg, todas as estirpes de MSSA e MRSA isoladas de infeções hospitalares apresentam um fenótipo de sensível. Em relação ao *imipenem* 10µg, todas as estirpes de MSSA isoladas de infeções hospitalares apresentavam fenótipo de sensível.

Para as estirpes de MRSA, como podemos observar na **tabela 5.10** as que foram codificadas com MR3, MR7, MR11 e MR12 mantiveram o fenótipo de resistência nas

diferentes concentrações de EGCG. As restantes estirpes eram sensíveis ao *imipenem* 10µg.

Tabela 5.10 - Avaliação de potencial sinergismo de EGCG com *imipenem* 10µg, em estirpes de MRSA hospitalares, em que S-sensível e R-resistente.

A linha a vermelho indica as estirpes que apresentavam fenótipo de resistência ao *imipenem* e onde não se verificaram alterações com as diferentes concentrações de EGCG.

Fenótipo de Resistência à Meticilina	Amostras biológicas	Imip + 250 µg/ml EGCG	Imip + 100 µg/ml EGCG	Imip + 50 µg/ml EGCG	Imip + 25 µg/ml EGCG
	MR1:Exs.Purulento de ferida da mão	S	S	S	S
	MR2:Exs.Purulento de ulcera pé	S	S	S	S
	MR3:Expectoração	R	R	R	R
	MR4:Lavado broncoalveolar	S	S	S	S
	MR5:Hemocultura	S	S	S	S
	MR6:Exs.purulento - pé	S	S	S	S
M	MR7:Biópsia úlcera pressão	R	R	R	R
R	MR8:Exs. Purulento	S	S	S	S
S	MR9:Hemocultura	S	S	S	S
A	MR10:Biópsia/fragmento tecido - amputação	R	R	R	R
	MR11:Hemocultura - catéter	R	R	R	R
	MR12:Exs.purulento aspirado - hérnia inguino-escrotal	R	R	R	R
	MR13:Exs.purulento zaragatoa - pele queimada	S	S	S	S
	MR14:Exs. Ferida operatória	S	S	S	S
	MR15:Hemocultura	S	S	S	S
	MR16:Hemocultura	R	R	R	R

## 5.6 Co - exposição de EGCG com *Imipenem*, *Tetraciclina*, *Gentamicina* e *Amoxicilina* em estirpes isoladas da comunidade

A co-exposição de EGCG em diferentes concentrações com os antibióticos *imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg para estirpes de MSSA e MRSA da comunidade, foi realizada através de testes de sensibilidade a antibióticos, onde foram feitas leituras às 18, 24 e 48h para medição das zonas de inibição, de modo a verificar se o EGCG potencia a ação dos antibióticos usados tendo efeito sinergista.

Com esta co-exposição vamos comparar o comportamento entre as estirpes de MSSA e MRSA da comunidade e verificar se de fato existe sinergismo.

A partir dos resultados obtidos, foram elaborados gráficos de barras com as diferentes concentrações de EGCG com os antibióticos usados, tamanho da zona de inibição medido em centímetros, em estirpes de MSSA e MRSA em cada momento de leitura (18h **gráfico 5.1**; 24h **gráfico 5.2** e 48h **gráfico 5.3**).

As médias das zonas de inibição para as estirpes isoladas da comunidade sem exposição ao EGCG foram para o *imipenem* 10µg 4,58; *tetraciclina* 30µg 3,15; *gentamicina* 30µg 2,60 e para *amoxicilina* 25µg 2,41.

No que respeita aos efeitos da co-exposição da EGCG com os antibióticos testados, observam-se diferenças muito significativas nas estirpes de MSSA com o *imipenem* 10µg e a *amoxicilina* 25µg entre as 18h de exposição (**gráfico 5.1**) e as 24h de exposição (**gráfico 5.2**) ( $p=0.001$  e  $p=1.51E-05$ , respetivamente). As médias das medições das zonas de inibição na co-exposição de EGCG com *imipenem* 10µg para estirpes MSSA às 18h nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25µg/ml) são: 4,71; 4,71; 4,61 e 4,66 respetivamente. Para o *imipenem* às 24h são: 4,98; 4,92; 4,84 e 4,84 respetivamente.

A co-exposição de EGCG com a *amoxicilina* 25µg, as médias para as medições das zonas de inibição nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25µg/ml) às 18h são: 2,94; 2,91; 2,91 e 2,84 respetivamente. Para as 24h: 2,54; 2,56; 2,52 e 2,46 respetivamente. Quando analisamos os dados das estirpes de MRSA entre as 18h e 24h de exposição ao *imipenem* 10µg, observamos que existem diferenças muito significativas ( $p=3.27E-05$ ).

As médias das medições das zonas de inibição na co-exposição de EGCG com *imipenem* 10µg para estirpes de MRSA nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25µg/ml) às 18h são: 3,83; 3,86; 3,93 e 3,87 respetivamente. Para as 24h de co-exposição as médias são: 4,17; 4,14; 4,16 e 4,11 repetivamente.

Para a co-exposição com a *amoxicilina* 25µg, as médias das zonas de inibição nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25µg/ml) às 18h são: 2,17; 2,37; 2,47 e 2,41 respetivamente. Para as 24h as médias são: 2,5; 2,52; 2,51 e 2,52 respetivamente.

Entre as 24h e 48h de exposição (**gráfico 5.3**) verificamos apenas diferenças para a *amoxicilina* ( $p=0.0002$ ). As médias das medições das zonas de inibição às 48h nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25µg/ml) com a *amoxicilina* para estirpes de MSSA: 2,18; 2,15; 2,33 e 2,23 respetivamente. Para estirpes de MRSA: 2,38; 2,36; 2,29 e 2,29 respetivamente.

Por outro lado, para o mesmo tempo de exposição, também se observam diferenças entre estirpes de MSSA e MRSA nomeadamente às 18h de exposição a EGCG com o *imipenem* e *amoxicilina* ( $p=2.88E-07$  e  $p=0.0002$ , respetivamente).

Às 24h e 48h apenas se verifica para o *imipenem* ( $p=8.06E-07$  e  $p=6.51E-06$ , respetivamente). As médias das medições das zonas de inibição às 48h nas diferentes diluições (250; 100; 50 e 25 $\mu$ g/ml) com o *imipenem* às 48h para estirpes de MSSA são: 5,03; 5,05; 5,08 e 4,98 respetivamente e estirpes de MRSA: 4,21; 4,18; 3,98 e 4,03 respetivamente.

Em relação à *tetraciclina* e *gentamicina* não se observaram divergências significativas.

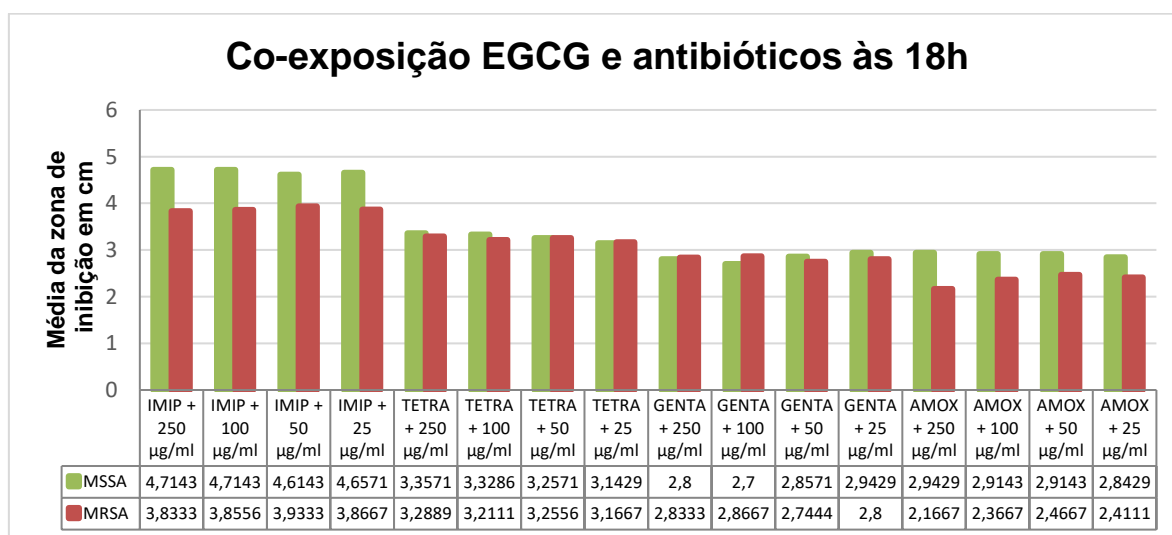


Gráfico 5.1 – Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 18h (*imipenem* 10 $\mu$ g; *tetraciclina* 30 $\mu$ g; *gentamicina* 30 $\mu$ g e *amoxicilina* 25 $\mu$ g) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

### Co-exposição EGCG e antibióticos às 24h



Gráfico 5.2 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 24h (*imipenem* 10µg; *tetraciclina* 30µg; *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

### Co-exposição de EGCG e antibióticos às 48h

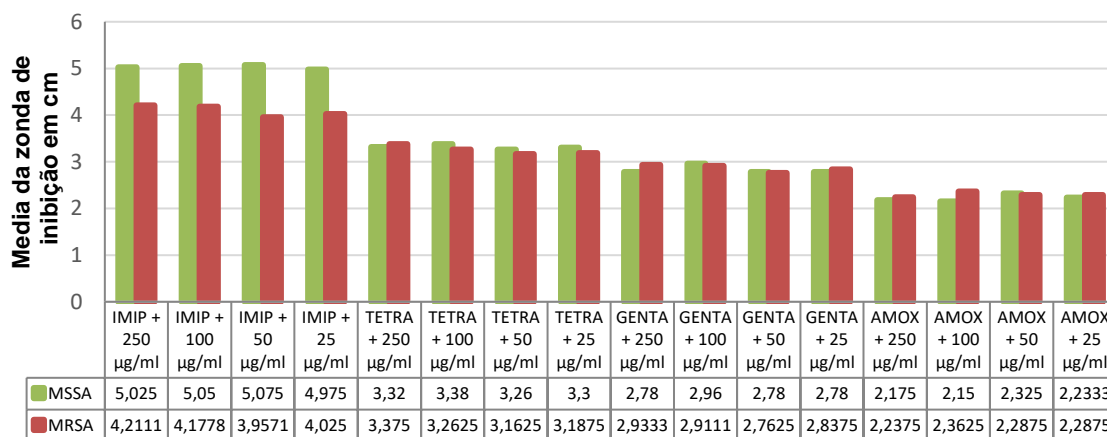


Gráfico 5.3 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 48h (*imipenem* 10µg; *tetraciclina* 30µg; *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

## **5.7 Co-exposição de EGCG com *Imipenem*, *Tetraciclina*, *Gentamicina* e *Amoxicilina* em estirpes isoladas de infeções hospitalares**

Para as estirpes isoladas de infeções hospitalares, procedeu-se do mesmo modo que para as estirpes da comunidade.

A co-exposição de EGCG em diferentes concentrações com os antibióticos *imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg para estirpes de MSSA e MRSA hospitalares, foi realizada através de teste de sensibilidade a antibióticos, onde foram realizadas leituras às 18h, 24h e 48h para medição das zonas de inibição, de modo a verificar se o EGCG potencia a ação dos antibióticos usados demonstrando efeito sinergista.

Com a co-exposição conseguimos comparar as duas estirpes, MSSA e MRSA, e verificar o efeito que a EGCG tem, e se de alguma forma influencia a ação dos antibióticos, potenciando-os.

A partir dos resultados obtidos, foram elaborados gráficos de barras com as diferentes concentrações de EGCG com os antibióticos usados, tamanho da zona de inibição em centímetros, em estirpes de MSSA e MRSA em cada momento de leitura (18h **gráfico 5.4**; 24h **gráfico 5.5** e 48h **gráfico 5.6**).

Em relação aos efeitos do tempo de co-exposição de EGCG com os antibióticos testados, observamos uma diferença significativa nas estirpes de MSSA com a *amoxicilina* 25µg entre as 24h e as 48h de exposição ( $p=0.01$ ). Para a co-exposição às 24h para estirpes de MRSA as médias obtidas nas medições das zonas de inibição para as diferentes diluições de EGCG (250; 100; 50 e 25µg/ml) são: 0,96; 1,03; 1,02 e 1,01 respetivamente. Para as 48h as médias são: 0,97; 1,03; 1,01 e 1,01 respetivamente.

Também se verificam diferenças entre estirpes de MSSA e MRSA, para o mesmo tempo de exposição, nomeadamente após a co-exposição de EGCG com *imipenem* 10µg e *amoxicilina* 25µg às 18h ( $p=2.45E-05$  e  $p=6.49E-08$ , respetivamente), e para exposições de 48h ( $p=4.84E-05$  e  $p=1.23E-08$ , respetivamente). As médias para estirpes de MSSA às 18h com *imipenem* são: 3,94; 4,34; 4,53 e 4,56 respetivamente. Para a *amoxicilina* para a mesma hora de exposição, as médias são: 2,2; 2,33; 2,38 e 2,31 respetivamente. Para as 48h de exposição ao *imipenem* as médias são: 4,18; 4,81; 5,07 e 5,01 respetivamente. Para a *amoxicilina* no mesmo tempo de exposição, as médias são: 2,46; 2,62; 2,56 e 2,58 respetivamente.

Nas estirpes de MRSA para as 18h de exposição com o *imipenem*, as médias são: 2,23; 2,49; 2,28 e 2,61 respetivamente. Para o mesmo tempo de exposição, para a *amoxicilina* as médias são: 0,95; 1,01; 1,02 e 1,01 respetivamente. Às 48h de exposição com o *imipenem*, as médias são: 2,32; 2,55; 2,36; 2,7 respetivamente. Para o mesmo tempo de exposição, mas para a *amoxicilina*, as médias são: 0,97; 1,03; 1,01; 1,01 respetivamente.

Para a *tetraciclina* 30µg e *gentamicina* 30µg não se observaram divergências significativas após as 18h, 24h e 48h.

Quando analisamos as divergências entre os dados das estirpes comensais com as estirpes hospitalares, em todos os tempos de exposição e para os antibióticos testados, observamos que existem diferenças extremamente significantes ( $p < 0,001$ ) (Apêndice II), exceto para a co-exposição de EGCG com *imipenem* em estirpes de MSSA.

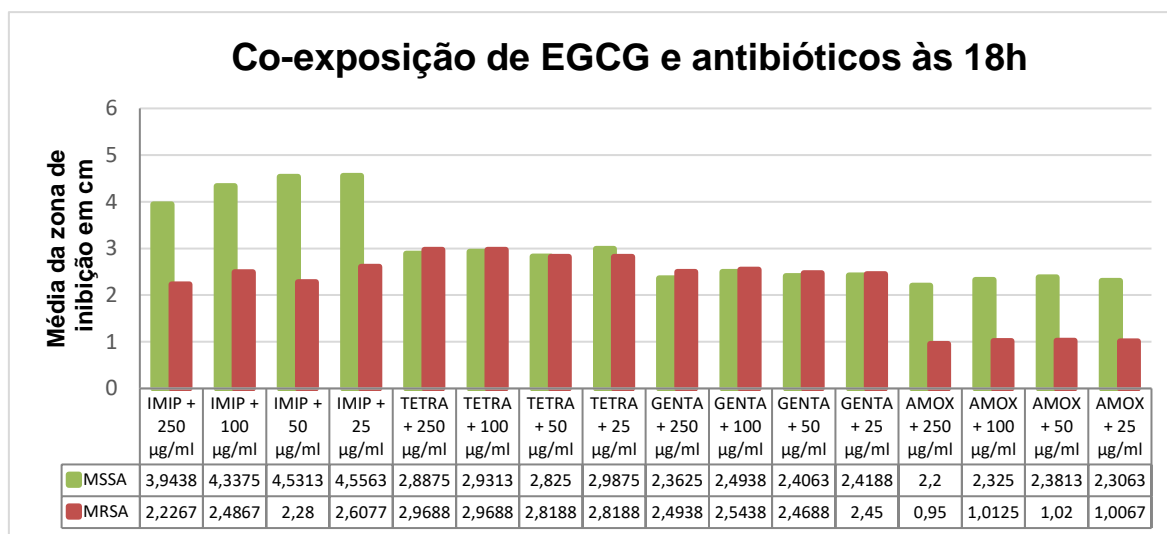


Gráfico 5.4 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 18h (*imipenem* 10µg; *tetraciclina* 30µg; *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

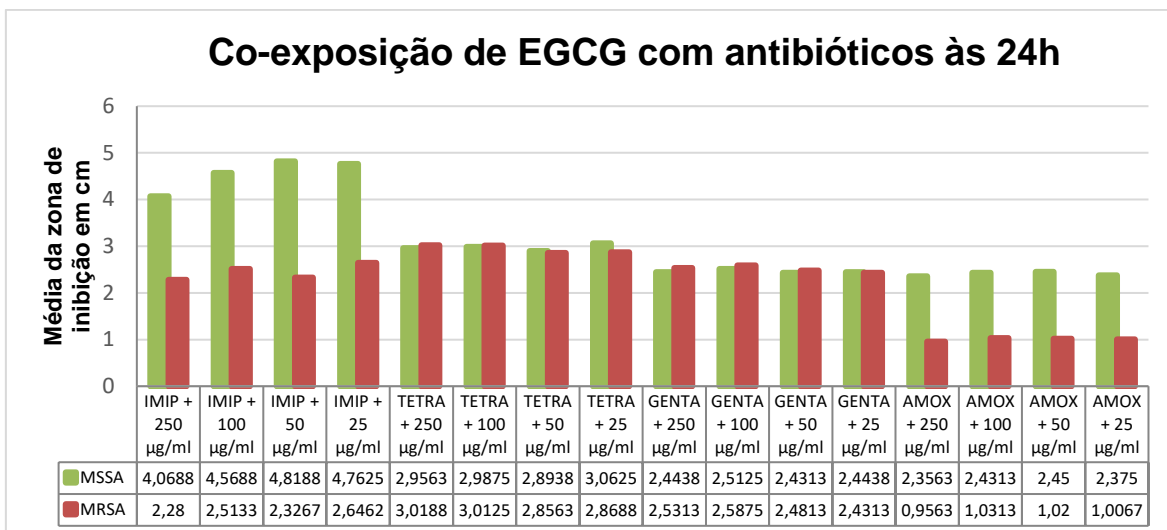


Gráfico 5.5 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 24h (*imipenem* 10µg; *tetraciclina* 30µg; *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

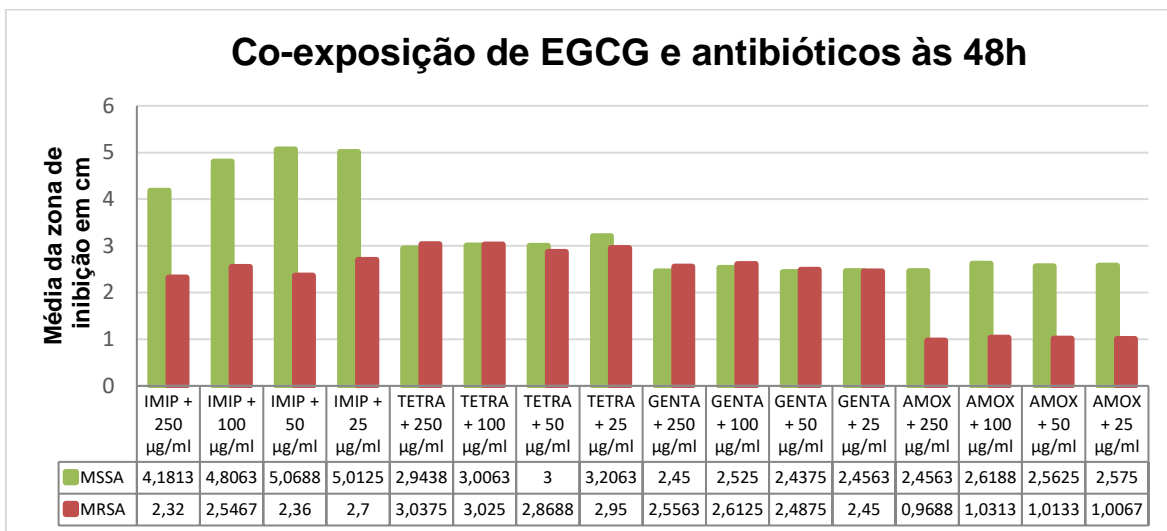


Gráfico 5.6 - Co-exposição de EGCG com diferentes antibióticos às 48h (*imipenem* 10µg; *tetraciclina* 30µg; *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg) em estirpes de MSSA e MRSA hospitalares. As médias das zonas de inibição (cm) para cada estirpe nas diferentes concentrações estão representados na tabela.

## 5.8 Crescimento de estirpes *S. aureus* da comunidade e de infecções hospitalares expostas a EGCG

De forma a avaliar o potencial efeito da EGCG no crescimento bacteriano, foram feitas quatro diluições 250; 100; 50 e 25µg/ml, onde foram inoculadas as estirpes da comunidade e estirpes hospitalares, com uma densidade inicial igual (0,5 McF).

Foram feitas leituras das densidades óticas às 18, 24 e 48h de modo a avaliar o crescimento bacteriano.

No que respeita ao crescimento de estirpes isoladas da comunidade (**gráfico 5.7**), observa-se um crescimento divergente entre estirpes de MSSA e MRSA somente após as 48h ( $p=0.02$ ). A média das densidades óticas para as diferentes diluições de EGCG (250; 100; 50 e 25µg/ml) em estirpes de MSSA às 48h são: 2,89; 3,08; 2,66 e 2,87 respetivamente. E para estirpes de MRSA: 3,09; 3,59; 3,22 e 3,3 respetivamente.

Por outro lado, em estirpes isoladas de infecções hospitalares, MSSA e MRSA (**gráfico 5.8**) as diferenças significativas ocorreram entre as 24h e 48h de exposição a EGCG ( $p=0.02$  e  $p=0.01$ , respetivamente). A média das densidades óticas para as diferentes diluições de EGCG (250; 100; 50 e 25µg/ml) em estirpes de MSSA às 24h são: 2,52; 3,18; 3,55 e 3,38 respetivamente. Para estirpes de MRSA: 3,58; 4,21; 4,36 e 4,03 respetivamente.

Às 48h a média das densidades óticas para estirpes de MSSA são: 3,86; 4,41; 4,56 e 4,77 respetivamente. Para as estirpes de MRSA são: 5,09; 5,29; 5,12 e 4,98 respetivamente.

Adicionalmente, quando comparamos estirpes de MRSA isoladas da comunidade com as estirpes de MRSA isoladas em amostras hospitalares, verificamos que as estirpes hospitalares demonstram um crescimento mais elevado em comparação com estirpes de MSSA. Essas diferenças são visíveis quando comparamos os dois gráficos (**gráfico 5.7 e 5.8**).

É também importante referir que foram observadas diferenças extremamente significantes ( $p<0,001$ ) entre estirpes isoladas da comunidade e isoladas de infecções hospitalares, no que se refere ao seu crescimento sendo superior nas estirpes de origem em amostras hospitalares para todos os pontos temporais avaliados, nomeadamente às 18h MSSA  $p=0,0003$ ; 18h MRSA  $p=8,956E-05$ ; às 24h MSSA  $p=0,014$ ; 24h MRSA  $p=0,0006$  e às 48h MSSA  $p=0,0004$ ; 48h MRSA  $p=6,24E-06$ .

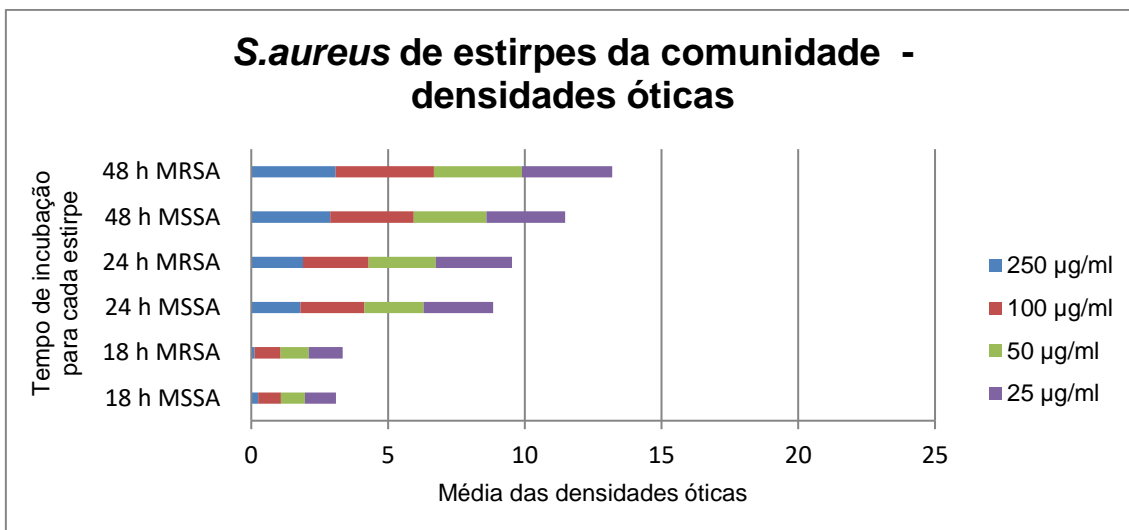


Gráfico 5.7 - Densidades óticas de *S. aureus* (MSSA e MRSA) de estirpes da comunidade com as diferentes concentrações de EGCG que estão representadas a azul - 250µg/ml; a vermelho - 100µg/ml; a verde - 50µg/ml e a roxo -25 µg/ml), com leituras às 18, 24 e 48h.

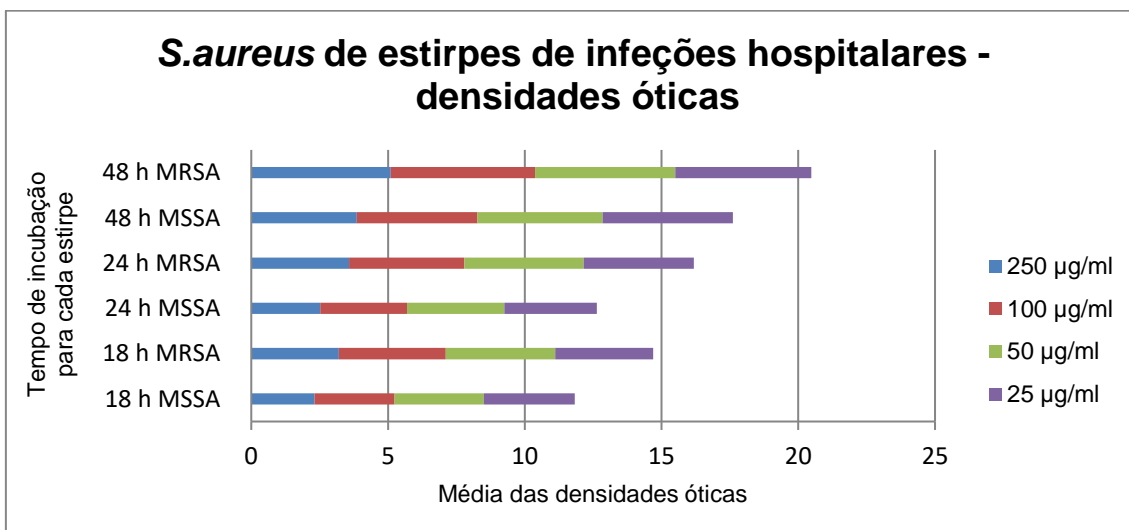


Gráfico 5.8 - Densidades óticas de *S. aureus* (MSSA e MRSA) de estirpes de infeções hospitalares com as diferentes concentrações de EGCG, que estão representadas a azul - 250µg/ml; a vermelho - 100µg/ml; a verde - 50µg/ml e a roxo -25 µg/ml), com leituras às 18, 24 e 48h.



## 6. Discussão de resultados e conclusão

---

### 6.1 Discussão

O presente estudo tinha como questões de partida o potencial terapêutico da EGCG na reversão do fenótipo de resistência em agentes microbianos como o MRSA, e se existem divergências de sinergismo entre estirpes isoladas da comunidade e estirpes isoladas de infecções hospitalares.

Ao longo dos últimos anos tem-se observado um aumento da resistência aos antibióticos de microrganismos patogênicos para o Homem. Este, tem-se tornado num grave problema mundial com consequências graves a nível da saúde, mas também com consequências para a economia do país, o que tem suscitado algumas preocupações no que respeita à prescrição e uso intensivo de antibióticos (1–4).

As infeções provocadas por *S.aureus*, deixaram apenas de ser um problema exclusivo associado a ambientes hospitalares e estão a tornar-se num problema emergente na comunidade (86). Vários estudos tentaram encontrar novas abordagens focadas no uso de produtos ou compostos naturais com propriedades terapêuticas (11,19,20). O uso da catequina EGCG do chá verde foi uma dessas abordagens, assim como o estudo das suas propriedades benéficas (21–23). Já foi comprovado em vários estudos que a EGCG tem propriedades anti-infecciosas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, em alguns fungos e vírus (11,24,25).

Com base em estudos realizados, o objetivo deste projeto foi analisar o potencial antimicrobiano da EGCG do chá verde na reversão do fenótipo de resistência, assim como verificar o potencial sinergismo com antibióticos com diferentes mecanismos de ação contra estirpes de *S. aureus* (MSSA e MRSA) isoladas de infecções hospitalares e da comunidade.

Para isso, foram recolhidas amostras de estirpes de MSSA e MRSA de voluntários e estirpes de MSSA e MRSA de infecções hospitalares obtidas num laboratório de microbiologia de um hospital de Lisboa.

Analisando os dados das estirpes isoladas da comunidade, verificamos que 42,1% das amostras recolhidas em voluntários com exposição ocupacional hospitalar eram positivas para *S. aureus* (18,4% MSSA e 23,7% MRSA).

Estudos realizados em Portugal enfatizam que o principal modo de transmissão de MRSA é através das mãos, sendo que a ausência de uma correta higienização das

mãos constitui o modo mais comum de transmissão (33,87) e uma vez que os profissionais de saúde estão expostos a pacientes que possam estar contaminados o não cumprimento das regras de higienização pode ser uma forma de disseminar o MRSA dentro e fora do ambiente hospitalar, mas também na comunidade (33,88). É assim de extrema importância alertar para a correta higienização das mãos bem como o uso de luvas aquando o contacto com os pacientes.

Como referido anteriormente o *S. aureus* tem a capacidade de colonizar diferentes zonas do corpo humano, tendo como preferência a nasofaringe (32), com capacidade de se disseminar, sendo transmitido por contacto direto (principalmente pelas mãos) ou indireto (superfícies contaminadas) (89). Uma das suas características biológicas fundamentais é a capacidade de colonizar a população saudável de forma assintomática (portador assintomático), assumindo assim um papel importante na disseminação a outras zonas do corpo, a outras pessoas e até mesmo contaminar comida e superfícies aquando o manuseio (6,89). Esta colonização é considerada um fator de risco para o aparecimento de infeções por *S. aureus* frequentemente aliadas à resistência à metilina – MRSA, aumentando o risco de ocorrência de doença clínica (5,89,90).

Atualmente existem vários antibióticos com diferentes modos de ação, nomeadamente inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese de proteínas; inibição da síntese de ácidos nucleicos; destruição da função da membrana celular, e inibição do metabolismo. Neste estudo, as estirpes foram submetidas à ação de quatro antibióticos: *imipenem* 10µg, *tetraciclina* 30µg, *gentamicina* 30µg e *amoxicilina* 25µg, com o EGCG em diferentes concentrações, de modo a avaliar o sinergismo e poder definir o seu fenótipo de resistência. Os β-lactâmicos como *amoxicilina*, e o *imipenem* (pertencente ao sub-grupo das carbapenemes) têm como mecanismo de ação a síntese de peptidoglicano, interferindo assim na síntese da parede celular bacteriana levando à lise celular (15,54,55,58,61,68,69).

Ao avaliarmos o sinergismo entre a EGCG e estirpes com fenótipo de resistência da comunidade verificamos que houve alterações de fenótipo de resistente para sensível em algumas das amostras estudadas.

O sinergismo entre a EGCG foi observado para o *imipenem* 10µg e para a *amoxicilina* 25µg. Embora, apenas uma estirpe apresentava fenótipo de resistência ao *imipenem* 10µg, quando exposta às diferentes concentrações de EGCG, este fenótipo passou a sensível, demonstrando que existiu sinergismo.

Em relação à *amoxicilina* 25µg, das estirpes testadas, 10 apresentavam fenótipo de resistência, mas ao serem expostas às diferentes concentrações de EGCG, 3 estirpes reverteram o fenótipo de resistente para sensível, uma reverteu o fenótipo nas concentrações de 250µg/ml; 100µg/ml e 50µg/ml, mas na concentração de 25µg/ml o fenótipo de resistência manteve-se. E em duas estirpes apenas nas concentrações de 250µg/ml e 100µg/ml de EGCG é que se verificou uma reversão de fenótipo. Embora o número de estirpes recolhidas da comunidade seja reduzido, conseguimos verificar que para os antibióticos que têm como mecanismo de ação a síntese da parede celular, existiu um sinergismo com EGCG, o que vai de encontro com alguns estudos já realizados (11,24), como estudos efetuados por *Yam* e os seus colaboradores, que demonstraram que extratos de chá verde conseguem reverter o fenótipo de resistência em estirpes de MRSA (27). E num estudo realizado por *Zhao* e os seus colaboradores onde comprovaram que a EGCG em concentrações de 25µg/ml consegue reverter o fenótipo de resistência (71).

A *gentamicina* é um antibiótico de amplo espectro na classe dos aminoglicosídeos (2,57) e o seu mecanismos de ação é a sua ligação à subunidade ribossomal 30S, incapacitando a bactéria de sintetizar proteínas (2,57,58). A combinação de antibióticos, como *tetraciclina*, *gentamicina*, *penicilina*, β-lactâmicos, *carbapenemes* com EGCG, mostraram reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos e aumentar a suscetibilidade de MRSA a estes, revelando alto potencial sinérgico (2,10,11,68,69,91,92). Estudos realizados em Itália forneceram mais informações acerca dos efeitos da EGCG, e comprovaram em concentrações de 50mg/ml são capazes de reverter a resistência à *tetraciclina* em isolados de *Staphylococcus* (76,93). Das estirpes isoladas de infeções hospitalares, apenas duas estirpes de MSSA reverteram o fenótipo de resistente para a *amoxicilina* 25µg, mas esta reversão só se observou nas concentrações de 250µg/ml; 100µg/ml e 50µg/ml de EGCG.

Nas estirpes de MRSA todas mantiveram o fenótipo de resistência, ou seja, aqui não se verificou o sinergismo. Quando analisamos os resultados obtidos entre EGCG e *gentamicina* 30µg, para as estirpes de MSSA apenas uma era resistente, e após exposição manteve a resistência. Em relação às estirpes de MRSA, 3 amostras apresentavam fenótipos de resistência inicial, quando expostas a EGCG duas reverteram para sensíveis, e uma apenas reverteu o fenótipo para sensível nas concentrações de EGCG 250µg/ml; 100µg/ml.

Dados de estudos anteriores reportam que a concentração mínima CMI de EGCG contra *S. aureus* varia entre 50 - 100 µg/ml (67,70).

Os resultados obtidos demonstram que a EGCG reverte os fenótipos de resistência, embora levante algumas questões no que respeita às diferenças entre as duas estirpes. Testes de sensibilidade a antibióticos realizados num estudo, revelaram que a maioria das estirpes de CA-MRSA isoladas eram sensíveis à maioria dos antibióticos comumente prescritos, quando comparados com estirpes de HA-MRSA (94).

De futuro deverão ser realizados estudos genómicos de forma a compreender as diferenças de suscetibilidade entre estirpes.

No que respeita aos resultados obtidos na co-exposição da EGCG com os diferentes antibióticos, observamos que existem diferenças nas estirpes MSSA e MRSA da comunidade, entre as 18h e 24h de exposição para *imipenem* e *amoxicilina*. Para a amoxicilina apenas verificamos diferenças entre as 24h e 48h.

Em estirpes hospitalares, a co-exposição de EGCG demonstrou que existem diferenças significativas nas estirpes de MSSA com a *amoxicilina* entre as 24h e 48h e para o *imipenem* e *amoxicilina*, apenas se observaram diferenças entre MSSA e MRSA às 18h e às 48h. Ao compararmos as divergências entre dados das estirpes da comunidade com as estirpes hospitalares, em todos os tempos de exposição e antibióticos testados, verificamos diferenças muito significativas ( $p < 0.01$ ), contrariamente para a co-exposição de EGCG com *imipenem* em estirpes de MSSA onde não verificamos alterações significativas. Estes dados vão de encontro a resultados obtidos em outros estudos, como *Parvez et al*, comprovaram existir sinergismo da EGCG com *gentamicina* em concentrações de 125µg/ml contra *S. aureus* (2), e para verificar o sinergismo entre EGCG e *imipenem*, *Hu e Zhao et al* verificaram que em concentrações de 25µg/ml esse sinergismo era observado (11,24,68).

As estirpes de *S. aureus* da comunidade e de infeções hospitalares, demonstram diferenças de crescimento quando expostas às diferentes concentrações de EGCG.

Nas estirpes da comunidade, observamos um crescimento divergente entre estirpes de MSSA e MRSA após as 48h.

Por outro lado, nas estirpes hospitalares observamos diferenças significativas entre as 24h e 48h de exposição a EGCG.

Importante referir que foram observadas diferenças óbvias entre estirpes da comunidade e hospitalares, onde se observa um maior crescimento nas estirpes

hospitalares, o que pode dever-se às diferenças fenotípicas, genéticas e moleculares de cada estirpe.

As principais diferenças entre as estirpes encontram-se no tipo de *SCCmec*, que é responsável pela resistência a antibióticos. Estirpes de CA-MRSA possuem *SCCmec* tipo IV ou V (apresentando apenas resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos), enquanto as estirpes de HA-MRSA possuem *SCCmec* tipo I, II ou III (possuem genes que codificam a resistência a várias classes de antibióticos) (94–98).

Ao longo do desenvolvimento do estudo foram encontradas algumas limitações, nomeadamente o número reduzido de amostras da comunidade, o tempo para obtenção de autorizações por parte do Conselho de Ética e Conselho de Administração do hospital em questão, limitações orçamentais, alteração de programação devido à pandemia COVID.

Contudo, este estudo permitiu demonstrar / confirmar o potencial antimicrobiano e sinergista da EGCG com os antibióticos que inibem a síntese da parede celular (*imipenem* e *amoxicilina*) em estirpes de *S. aureus*, em particular estirpes de MSSA mas também permitiu verificar que existem divergências entre as estirpes comensais e as estirpes hospitalares.

## 6.2 Conclusão

As infeções provocadas por *S. aureus*, deixaram apenas de ser um problema exclusivamente associado a ambientes hospitalares e passaram a ser também um problema emergente na comunidade, com consequências não só para a saúde pública, mas também para a economia do país.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a reversão de fenótipo de resistência, embora se tenha verificado diferenças significativas entre estirpes de MSSA e MRSA comensais e hospitalares.

Este trabalho corrobora o potencial da EGCG para tratamento antimicrobiano e/ou adjuvante terapêutico contra microrganismos resistentes a antibióticos.



## 7. Perspetivas futuras

---

A crescente necessidade de identificar novos compostos antimicrobianos e/ou adjuvantes terapêuticos, com poucos ou nulos efeitos secundários (não tóxicos), principalmente em estirpes resistentes e multirresistentes é uma mais-valia tanto para infeções hospitalares como infeções da comunidade.

Em termos de inovação, este estudo incrementa a informação existente referente a novas opções, nomeadamente na utilização da EGCG na reversão do fenótipo de resistência em bactérias resistentes a antibióticos.

Para dar continuidade a este estudo, seria importante aumentar o número de amostras da comunidade bem como hospitalares, possibilitando assim uma análise estatística mais completa.

Aumentar o tempo de exposição para 72h de forma a verificar se existe alteração no fenótipo de resistência nas estirpes que não reverteram até às 48h.

Testar o sinergismo da EGCG com outros antibióticos com mecanismos de ação diferentes, como por exemplo os antibióticos que inibem a síntese de DNA, de modo a verificar se se observam alterações de fenótipos.

Considerando o potencial epigenético previamente descrito e estabelecido do EGCG (99,100), seria extremamente relevante avaliar os potenciais efeitos epigenéticos induzidos pela exposição à EGCG nas diferentes estirpes isoladas neste estudo incluindo o potencial silenciador epigenético do gene *mecA*.

Realizar estudos genómicos de forma a compreender as diferenças de suscetibilidade entre estirpes.

Realizar estudos *in vivo* de modo a avaliar o potencial da EGCG na reversão do fenótipo de resistência do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e potenciais efeitos em parâmetros hematológicos, como leucograma, após toma diária de cápsulas de chá verde (225mg de EGCG/cápsula).



## 8. Referências bibliográficas

---

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Parvez KA, Saha K, Rahman J, Munmun AR, Rahman A, Dey KS, et al. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate ( EGCG ) with gentamicin against MDR pathogens. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(May):e02126. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02126>
3. Smith, D.L.; Harris, A.D.; Johnson, J.A.; Silbergeld, E.K.; Morris Jr G. Animal antibiotic use has an early and important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *PNAS*. 2002;99:6434–9.
4. Moris, A.K; Masterton RG. Antibiotic resistance surveillance: action for international studies. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2002;49(1):7–10. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/49.1.7>
5. Ribeiro E. Human methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) colonization : a major public health concern? *SAÚDE & TECNOLOGIA*. (22):5–7.
6. Luis A, Santos O, Freitas D, Carlos C, Alves Ferreira L, Rodrigues R, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2007;43(6):413–23. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541938005>
7. Peres D, Neves I, Vieira F, Devesa I. Estratégia para controlar o *Staphylococcus Aureus* resistente à metilina: A experiência de cinco anos de um hospital. *Acta Med Port*. 2014;27(1):67–72.
8. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococci* in Europe. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2003;9(12):1179–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00698.x>
9. Tong, S.Y.C.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Jr. Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015;28. Available from: <https://cmr.asm.org/content/28/3/603>
10. Reygaert WC. The antimicrobial possibilities of green tea. *Front Microbiol*. 2014;5(AUG):1–8.
11. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of

- epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea - Review. *Br J Pharmacol.* 2013;168(5):1059–73.
12. Levinger O, Bikels-Goshen T, Landau E, Fichman M, Shapira R. Epigallocatechin Gallate Induces Upregulation of the Two-Component VraSR System by Evoking a Cell Wall Stress Response in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(22):7954–9.
  13. Stapleton PD, Shah S, Ehlert K, Hara Y, Taylor PW. The  $\beta$ -lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 2007;153(7):2093–103.
  14. Turner, N.A.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Maskarinec, S.A.; Eichenberger, E.M.; Shah, P.P.; Carugati, M.; Holland, T.L.; Fower Jr VG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:203–18.
  15. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:577–601.
  16. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1–103.
  17. B.C. Millar, A. Loughrey, J.S. Elborn JEM. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect.* 2007;67(2):109–13.
  18. Lee AS, Lencastre H De, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4(May):1–23.
  19. Betts JW, Hornsey M, Wareham DW. ASM 2014 In Vitro Activity of Epigallocatechin Gallate ( EGCG ) and Quercetin Alone and in Combination Versus Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2014;(May).
  20. Haghjoo B, Lee LH, Habiba U, Tahir H, Olabi M, Chu T-C. The synergistic effects of green tea polyphenols and antibiotics against potential pathogens. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013;04(11):959–67.
  21. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(12):1807–21.
  22. Martini N. Green tea. *J Prim Health Care.* 2016;8(4):381–2.

23. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. Hindawi [Internet]. 2017;2017:9. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/5615647>
24. Reygaert WC. Green Tea Catechins: Their use in Treating and Preventing Infectious Diseases-review article. Biomed Res Int. 2018;9.
25. Taha Yassen R, Kadhum Bakkir L, Muhammed R. in Vitro and in Vivo Study of Green and Black Tea Antimicrobial Activity on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. Basrah J Vet Res. 2011;10(2):1–12.
26. Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci Technol Bull. 2005;2:71–81.
27. Yam TS, Hamilton-Miller JM SS. The effects of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and Beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998;42(2):211–6.
28. Biedenbach, D.J.; Moet, G.J.; Jones, R.N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). ELSEVIER. 2004;
29. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. 2002;85:57–72.
30. Gnanamani, A.; Hariharan, P.; Satyaseela MP. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. In: Frontiers [Internet]. 2017. Available from: <https://www.intechopen.com/books/frontiers-in-i-staphylococcus-aureus-i-staphylococcus-aureus-overview-of-bacteriology-clinical-diseases-epidemiology-antibiotic-resistance->
31. Lowy RJGFD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. PMC. 2008;
32. Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. Ann Fam Med. 2006;4(2):132–7.
33. Negrinho, A.; Ferreira, B.; Serrano, D.; Ribeiro, E.; Shone S. Prevalência da colonização nasal por *Staphylococcus Aureus* resistente à metilina nos técnicos de análises clínicas e saúde pública num hospital do distrito de Lisboa: estudo de caso. Saúde e Tecnol. 2019;22:34–41.
34. Cosgrove, S.E.; Sakoulas, G.; Perencevich, E.N.; Schawaber, M.J.; Karchmer,

- A.W. Carmeli, Y.; Comparison of mortality associated with methicilin-resistant and methicilin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. 2003;
35. Murphy JT, Walshe R. Modelling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach. 2011;
  36. Sousa M.A. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina ( MRSA ): um pesadelo para a saúde pública. Rev Ciências da Saúde da ESSCVP. 2012;4:19–30.
  37. Millar, B.C.; Prendergast, D.B.; Moorre JE. Community-associated MRSA (CA-MRSA): an emerging pathogen in infective endocarditis. J Antimicrob Chemother. 2008;1–7.
  38. Smith TC. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience. 2015;398:1–8.
  39. Ribeiro J, Boyce JM, Zancanaro PQ. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) Among Patients Visiting the Emergency Room at a Tertiary Hospital in Brazil. 2005;9:52–5.
  40. Hirsch EF. The Treatment of Infected Wounds," Alexis Carrel's contribution to the care of wounded soldiers during World War I. pubmed. 2008;64(3):S209–S210.
  41. David R. Spring, Kieron M. G. O'Connell, James T. Hodgkinson, Hannah F. Sore, Martin Welch GPCS. Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials. 2013;
  42. João R, Roque F, Teixeira A. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas : breves notas sobre a sua evolução. 2016;4(1):77–84.
  43. Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. 2004;38.
  44. Garima Kapoor, Saurabh Saigal and AE. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol 2017;33(3)300–5 Pharmacol [Internet]. 2017;331. Garim(3):300–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672523/?report=reader>
  45. CDC. About Antimicrobial Resistance. Centers for Disease Control and Prevention.
  46. Soares, G.M.S.; Figueiredo, L.C.; Faveri, M.; Cortelli, S.C.; Duarte, P.M.;Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment

- and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. 2011;20(3):295–309.
47. Nogueira HS, Rejane A, Oliveira E De, Aparecido M, Xavier DS, Carvalho AA, et al. Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. 2016;18.
  48. Unakal OSCG. Gram Positive Bacteria [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>
  49. Pandey, N.;Casella M. Beta Lactam Antibiotics [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
  50. Antibióticos b-lactâmicos [Internet]. Available from: <https://slideplayer.com.br/slide/9932783/>
  51. Nakano, V.;Nishiyama, S.A.; Ávila-Campos MJ. Beta-lactamases: Sua importância na resistência bacteriana [Internet]. Available from: [http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com\\_content&view=article&catid=13%3Atemas-de-interesse&id=47%3Abeta-lactamases-sua-importancia-na-resistencia-bacteriana&Itemid=56&lang=br](http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&catid=13%3Atemas-de-interesse&id=47%3Abeta-lactamases-sua-importancia-na-resistencia-bacteriana&Itemid=56&lang=br)
  52. Pinhatti AV. Princípios gerais da terapia antimicrobiana [Internet]. Available from: <https://pt.slideshare.net/AmandaVallePinhatti/aula-antimicrobianos>
  53. Suárez, Cristina;Gudiol F. Antibióticos betalactâmicos. 2009;27(2):116–29.
  54. Imipenem [Internet]. Drugbank. 2020. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01598>
  55. Amoxicillin. Drugbank. 2020.
  56. Lumen Learning. Mechanisms of Antibacterial Drugs [Internet]. Available from: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>
  57. Gentamicin [Internet]. Drugbank. 2005. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00798>
  58. Foster TJ. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus . Current status and future prospects. FEMS Microbiol Rev. 2017;(December 2016):1–20.
  59. Tetracyclin [Internet]. Drugbank. 2020. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00759>
  60. Instituto nacional de saúde RicardoJorge. VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS RESISTÊNCIAS AOS ANTIMICROBIANOS [Internet]. Available from: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx#oque>
  61. Fernandes, Rúben;Amador P, Prude C. B-Lactams : chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Rev Med Microbiol. 2013;24:7–17.

62. Velázquez ME, C M, Me V. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. 2005;47(5):381–7.
63. Minimum concentration inhibitory [Internet]. Available from: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Boundless\)/13%3A\\_Antimicrobial\\_Drugs/13.5%3A\\_Measuring\\_Drug\\_Susceptibility/13.5A%3A\\_Minimal\\_Inhibitory\\_Concentration\\_\(MIC\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/13%3A_Antimicrobial_Drugs/13.5%3A_Measuring_Drug_Susceptibility/13.5A%3A_Minimal_Inhibitory_Concentration_(MIC))
64. Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, et al. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition. 2012. 18 p.
65. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. 2001;5–16.
66. Das S, Tanwar J, Hameed S, Fatima Z. Antimicrobial potential of epigallocatechin-3- gallate (EGCG ): a green tea polyphenol. J Biochem Pharmacol Res. 2014;2:167–74.
67. Abdoulmagd, E.; Al-Mohammed, I.; Al-Badry S. Synergism and postantibiotic effect of green tea extract and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol J. 2011;89–96.
68. Hu ZQ, Zhao WH, Asano N, Yoda Y, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(2):558–60.
69. Hu Z, Zhao W, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2001;48:361–4.
70. Yoda, Y.; Hu, ZQ.; Zhao, WH.; Shimamura T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. 2004;55–8.
71. Zhao W, Hu Z, Okubo S, Hara Y. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and  $\beta$ -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2001;45(6):1737–42.
72. synergism [Internet]. Available from: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/synergism%0D>
73. Bell JDT and JM. Antimicrobial Susceptibility on Solid Media. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, 6 Ed [Internet]. Available from: <https://doctorlib.info/pharmacology/antibiotics-laboratory-medicine/3.html>

74. Peng Q, Huang Y, Hou B, Hua D, Yao F, Qian Y. Green tea extract weakens the antibacterial effect of amoxicillin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infected mice. *Phyther Res.* 2010;24(1):141–5.
75. Lee S, Razqan GS Al, Kwon DH. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with  $\beta$ -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine.* 2017;24:49–55.
76. Roccaro, A.S.; Blanco, A.R.; Giuliano, F.;Rusciano, D.; Enea V. Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in *Staphylococci* by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):1968–73.
77. Ribeiro P. *Investigação e avaliação em psicologia e saúde.* Editora P, editor. Lisboa; 2010.
78. Fabienne Fortin M. *O processo de investigação : da concepção à realização.* 1999.
79. Fonseca, A. B.;Sebastião, C.; Martins, F.; Ribeiro, M.G.; Calheiros, I.; Lito, L.; Abecassis, M.B.; Pinto, M.I.; Spencer, M.O.C.; Pinheiro, M.P.F.; Costa, M.T.M.P.; Barros, R.M.; Bento RP. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. *Quim Nova [Internet].* 2004;193. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf>
80. Vancouver Costal Health. *Influenza-Like Illness ( ILI ) Outbreak Specimen Collection.* 2017.
81. ChromID MRSA Agar.
82. Jane FM, A. WM, Craig; WA, Eliopoulos; MNDGM, W. HD, Janet Hindler; Reller LB, et al. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão:Norma Aprovada– Oitava Edição.*
83. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2020;
84. Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial [Internet]. 2013. Available from: <https://ispup.up.pt/docs/declaracao-de-helsinquia.pdf>
85. Assembleia da república [Internet]. *Diário da República.* 2019. Available from: <https://dre.pt/application/file/a/123813850>
86. Gelatti LC, Becker AP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. 2009;84(5):501–6.
87. Mondal H, Gupta I, Nandi P, Ghosh P, Chattopadhyay S, Mitra GD. Nasal

- Screening of Healthcare Workers for Nasal Carriage of Methicillin Resistance *Staphylococcus Aureus* , Vancomycin Resistance *Staphylococcus Aureus* and Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus Aureus* in Burdwan Medical College and Hospital. 2016;3(11):3342–6.
88. Dulon M, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA carriage among healthcare workers in non-outbreak settings in Europe and the United States : a systematic review. 2014;14(1):1–14.
  89. Ribeiro, E; Clérigo A. Assessment of *Staphylococcus aureus* colonization in bakery workers. 2017;
  90. Ghasemzadeh-Moghaddam H., Neela V., Wamel W van;, Hamat RA., Shamsudin; M nor, Hussin NSC, et al. Nasal carriers are more likely to acquire exogenous *Staphylococcus aureus* strains than non-carriers. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2015;21(11):998.e1-998.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.006>
  91. Novy P, Rondevaldova J, Kourimska L, Kokoska L. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. Phytomedicine. 2013;20:432–5.
  92. Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-miller JMT, Taylor PW. Modulation of B-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. Int J Antimicrob Agents. 2004;23:462–7.
  93. Blanco, A.R.; Roccaro, A.S.;Spoto, G.C.; Nostro, A.; Rusciano D. Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular *Staphylococcal Isolates*. 2005;49(10):4339–43.
  94. Pathare NA, Tejani S, Asogan H, Mahruqi G Al, Fakhri S Al, Zafarulla R. Comparison of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Healthy Community Hospital Visitors [CA-MRSA] and Hospital Staff [HA-MRSA]. 2015;1–6.
  95. Peng H, Liu D, Ma Y, Gao W. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. Sci Rep [Internet]. 2018;(May):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36206-5>
  96. Vandenberg, M.F.Q.K.; Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : current perspectives. 2006;
  97. Bonesso, M.F.; Marques, S.A.; Cunha MLRS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ( CA- MRSA ): molecular background ,

- virulence , and relevance for public health. 2011;17(4):378–86.
98. Hsiao, C.H.; Ong, S.J.; Chuang C.C.; Ma, D.H.K.; Huang YC. A Comparison of Clinical Features between Community-Associated and Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Keratitis. 2015;2015.
  99. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. J Breast Cancer. 2013;16(1):23–31.
  100. Wu D Sen, Shen JZ, Yu AF, Fu HY, Zhou HR, Shen SF. Epigallocatechin-3-gallate and trichostatin A synergistically inhibit human lymphoma cell proliferation through epigenetic modification of *p16 INK4a*. Oncol Rep. 2013;30(6):2969–75.

## Parecer da Comissão de ética para a saúde



CENTRO HOSPITALAR  
UNIVERSITÁRIO DE LISBOA  
CENTRAL  
CES

### COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE

#### Parecer

**Data:** 24.10.2019

**Processo n.º 763/2019**

**Título:** "Potencial antimicrobiano da epigalocatequina-3-galato (EGCG) do chá verde contra MRSA de estirpes isoladas em infeções hospitalares e da comunidade"

**Relator(a):** Dra. Cristina Lima

**Investigadora Principal:** Dra. Ana Sofia Simoes Zeferino

**Local:** Patologia Clínica do Hospital de D. Estefânia, CHULC

#### **Parecer:**

Tese de Mestrado em Tecnologias clínico-laboratoriais do Instituto Politécnico de Lisboa Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

Objetivo: avaliar as variações na sensibilidade, potencial antimicrobiano e potencial sinergismo do EGCG entre estirpes isoladas de infeções hospitalares e de colonização da comunidade e avaliar os efeitos após 90 dias de consumo de EGCG na reversão do fenótipo de resistência *in vivo*.

A vertente do estudo *in vivo*, que testará indivíduos com isolamento de MRSA na orofaringe antes e 90 dias após a ingestão 225 mg/dia de EGCG não será realizado nem utilizará participantes recrutados no CHLC.

Para o estudo *in vitro* - determinação do sinergismo entre EGCG e os antibióticos - na placa de inoculação do MRSA será previamente inoculado EGCG com diferentes antibióticos.

As estirpes de MRSA serão recolhidas depois do seu processamento no laboratório de microbiologia do CHLC, sem qualquer identificação. A recolha das estirpes será supervisionada pela responsável pelo laboratório de microbiologia e o seu transporte é da responsabilidade da investigadora.

Este estudo não acarreta custos para a instituição e está superiormente autorizado.

Foi esclarecido pela investigadora, que o CHULC colaborará apenas no estudo *in vitro*, fornecendo as estirpes de MRSA.

#### **Conclusão:**

A Comissão de Ética apreciou o estudo na íntegra, mas limita a sua aprovação à vertente *in vitro*, que utilizará material recolhido nos laboratórios do CHULC.

O Presidente da Comissão de Ética

(Gonçalo Cordeiro Ferreira)

## Parecer do Serviço de Patologia Clínica – seção de Microbiologia

Exma. Sr.<sup>a</sup> Diretor do Serviço  
de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Lisboa Central,  
Dr. Carlos Flores

Eu, Ana Sofia Simões Zeferino, aluna de Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais na Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, venho solicitar autorização e a colaboração da seção de Microbiologia para poder realizar a recolha de estirpes isoladas de MRSA, necessárias para a investigação da minha Tese de Mestrado "**Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina-3-galato (EGCG) do Chá Verde contra MRSA de estirpes isoladas de infeções Hospitalares e da Comunidade**".

O objetivo da Tese é avaliar os efeitos, após 90 dias de consumo de EGCG, na reversão do fenótipo de resistência do MRSA *in vivo*, assim como avaliar possíveis efeitos a nível hematológico. Espera-se também poder avaliar potenciais variações na sensibilidade, no potencial antimicrobiano e potencial sinergismo do EGCG entre estirpes isoladas de infeções hospitalares e de colonização da comunidade, no que se refere a antibióticos com diferentes modos de ação, nomeadamente inibição da síntese da membrana celular, síntese proteica e síntese de ácidos nucleicos.

Desta forma, solicito a sua autorização para a recolha das estirpes após todo o seu processamento. Não será necessário qualquer tipo de identificação pessoal do doente, apenas o local de colheita e se a estirpe é MRSA.


Junto envio o respetivo resumo do projeto desta investigação, e o parecer hierárquico para a autorização.

Encontro-me à disposição de Vossa Excelência para qualquer contacto ou esclarecimento.

Agradecendo desde já a atenção dispensada e aguardando a resposta de Vossa Excelência.

Com os melhores cumprimentos,

Lisboa, 8/8/2019

  
(A investigadora Ana Sofia Zeferino)

Não tenho nada a opor.  
A recolha das estirpes  
Será supervisionada pelo  
Dr. Rui Mendes Pinto (coordenador)  
pelo laboratório de Microbio-  
logia e o transporte de  
material para os respectivos  
locais de investigação  
4-12-8-2019  
Rui Mendes Pinto

PARECER HIERÁRQUICO SOBRE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO NO CHLC

Projeto: Potencial antimicrobiano da Epigalocatequina-3-galato do Chá Verde contra MRSA de estirpes isoladas de infeções Hospitalares e da Comunidade.

Investigador principal: Ana Sofia Inês Zefina

Pareceres dos responsáveis pelas Áreas/Especialidades/Unidades Funcionais envolvidas:

É uma linha de investigação sobre a qual não tenho conhecimento

12/8/2017 Dr. CARLOS ROAL FLORES  
Responsável da Especialidade de Patologia Clínica do CHLC n.º mecanográfico 12453

Director

Responsável Lab. Microbiol. F2

07/08/2019 n.º mecanográfico 62064

n.º mecanográfico

## Parecer do Conselho de Ética (CE) da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

### CE-ESTeSL-Nº:18-2019 Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina 3 galato do Chá Verde contra MRSA de isolados Hospitalares e da Comunidade

2 mensagens

Conselho de Ética da ESTeSL - conselhoetica@estesi.pt  
Para: etna.ribeiro@estesi.pt  
Cc: sofiafz@gmail.com

19 de dezembro de 2019 às 18:12

REFERÊNCIA INTERNA: CE-ESTeSL-Nº:18-2019

TÍTULO DO PROJETO: Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina 3 galato do Chá Verde contra MRSA de isolados Hospitalares e da Comunidade

Tipo de Projeto/Estudo: Dissertação do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

INVESTIGADORA: Ana Sofia Simões Zafêrno

Orientador(es): Etna Ribeiro

INSTITUIÇÃO PROMOTORA: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa

Instituição(s) envolvidas: ESTeSL - H&TRC

RECEBIDO: 2 de julho de 2019

RESPOSTA: CE: 26 de julho de 2019

RESPOSTA-AO CE: 6 de setembro de 2019

RESPOSTA CE: 25 de Setembro de 2019

RESPOSTA-AO CE: 7 de Outubro de 2019

RESPOSTA DO CE: quinta-feira, 21 de novembro de 2019 18:19

RESPOSTA AO CE: 2019-11-25

RESPOSTA CE: 19-12-2019

Emm. Senhora Prof. Doutora Etna Ribeiro

Emm. Senhora Dra. Ana Sofia Simões Zafêrno, estudante de Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Após análise do projeto supracitado e os esclarecimentos de sete de outubro e vinte e cinco de novembro o Conselho de Ética (CE) da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), decidiu anuir por unanimidade parecer favorável.

# Apêndice I

---

Consentimento informado

## **CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO**

### **Projeto de investigação**

*Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina-3-galato do Chá Verde contra MRSA de isolados Hospitalares e da Comunidade*

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial do EGCG na reversão do fenótipo de resistência do *Staphylococcus aureus* resistente á metilina (MRSA) *in vivo* e potenciais efeitos em parâmetros hematológicos. Iremos também avaliar variações no potencial antimicrobiano do EGCG e sinergismo com diferentes antibióticos entre estirpes isoladas de infecções hospitalares (HA-MRSA) e isolados de colonização da comunidade (CA-MRSA).

De modo a concretizar os objetivos propostos, pretende-se recolher amostras nasofaríngeas e de sangue venoso antes e após a toma diária de cápsulas de chá verde as quais possuem 225mg de ECGC/cápsula.

A participação neste projeto de investigação é voluntária e livre, sem custos associados.

O participante tem o direito de recusar a qualquer instante a sua participação no estudo, sem que daí possam resultar quaisquer prejuízos e sem que seja comprometida a confidencialidade e privacidade dos dados obtidos até então.

Toda a informação fornecida é confidencial e será utilizada apenas para responder aos objetivos descritos. A informação que permite a identificação do participante (nome, contactos) será arquivada separadamente da restante informação e apenas será acessível aos responsáveis pela investigação. De acordo com as regras nacionais de proteção de dados, toda a informação recolhida poderá ser posteriormente modificada, atualizada ou retirada pelo participante/tutor legal.

Assinatura do investigador responsável: \_\_\_\_\_

Lisboa, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

### Identificação do participante

Nome: _____	Telefone: _____
Local de trabalho: _____	Correio eletrónico: _____

	Código do participante: _____ (a preencher pelo investigador responsável)	Rubrica
1	Li a informação ao participante “ CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO” fornecido. Tive oportunidade de analisar as informações, de colocar as questões que julguei necessárias e de obter respostas satisfatórias.	
2	Tomei conhecimento de que a minha participação é voluntária e de que posso desistir em qualquer altura, sem necessidade de justificação e sem prejuízo para os meus direitos assistenciais ou legais. A equipa de investigação mantém o direito, contudo, de utilizar quaisquer amostras colhidas antes da desistência, de forma confidencial.	
3	A equipa de investigação poderá entrar em contacto comigo durante o horário de trabalho para colher amostras e recolher informações pessoais depois de eu ter dado o meu consentimento para participar neste estudo.	
4	Autorizo a equipa de investigação a transferir as minhas amostras e/ou dados pessoais, de forma codificada para proteger a minha identidade, com fim de as analisar.	
5	Autorizo a equipa de investigação a conservar as minhas amostras e dados pessoais para futuros estudos que receberam aprovação ética. Os meus dados de contacto podem ser conservados exclusivamente para esta finalidade e não serão divulgados a terceiros.	
7	Tenho conhecimento de que não receberei qualquer contrapartida financeira pela participação neste estudo.	
8	Fui informado de que receberei informações sobre os meus resultados. Além disso, quando o estudo estiver concluído, receberei o resumo dos resultados coletivos finais do estudo. Desejo receber o resumo por correio eletrónico/correio no seguinte endereço:  _____	

Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira **assinar este documento**.

*Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo investigador.*

Data: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Nome completo do participante:

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante:

\_\_\_\_\_

Agradecemos a sua colaboração e estamos disponíveis para fornecer informação adicional ou esclarecer eventuais dúvidas.

Doutora Edna Ribeiro | e-mail: [edna.ribeiro@estesl.ipl.pt](mailto:edna.ribeiro@estesl.ipl.pt)

Ana Sofia Zeferino | e-mail: [sofiazef@gmail.com](mailto:sofiazef@gmail.com)

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa**

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE TRÊS PÁGINAS E FEITO EM DUPLICADO:  
UMA VIA PARA O INVESTIGADOR, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE

## Apêndice II

### Média da zona de inibição (cm) em estirpes de MSSA e MRSA da comunidade

	MRSA				MSSA			
		18h	24h	48h		18h	24h	48h
IMIP	250 µg/ml	3,833333	4,166667	4,211111	250 µg/ml	4,71428571	4,98	5,025
	100 µg/ml	3,855556	4,144444	4,177778	100 µg/ml	4,71428571	4,92	5,05
	50 µg/ml	3,933333	4,155556	3,957143	50 µg/ml	4,61428571	4,84	5,075
	25 µg/ml	3,866667	4,111111	4,025	25 µg/ml	4,65714286	4,84	4,975
TERTA	250 µg/ml	3,288889	3,344444	3,375	250 µg/ml	3,35714286	3,383333	3,32
	100 µg/ml	3,211111	3,255556	3,2625	100 µg/ml	3,32857143	3,416667	3,38
	50 µg/ml	3,255556	3,277778	3,1625	50 µg/ml	3,25714286	3,25	3,26
	25 µg/ml	3,166667	3,255556	3,1875	25 µg/ml	3,14285714	3,3	3,3
GENTA	250 µg/ml	2,833333	2,922222	2,933333	250 µg/ml	2,8	2,971429	2,78
	100 µg/ml	2,866667	2,888889	2,911111	100 µg/ml	2,7	3,128571	2,96
	50 µg/ml	2,744444	2,777778	2,7625	50 µg/ml	2,85714286	2,842857	2,78
	25 µg/ml	2,8	2,855556	2,8375	25 µg/ml	2,94285714	2,942857	2,78
AMOX	250 µg/ml	2,166667	2,5	2,2375	250 µg/ml	2,94285714	2,54	2,175
	100 µg/ml	2,366667	2,522222	2,3625	100 µg/ml	2,91428571	2,56	2,15
	50 µg/ml	2,466667	2,511111	2,2875	50 µg/ml	2,91428571	2,52	2,325
	25 µg/ml	2,411111	2,522222	2,2875	25 µg/ml	2,84285714	2,46	2,233333

### Média das densidades óticas - comunidade

	Média					Média			
		18h	24h	48h			18h	24h	48h
MSSA	250 µg/ml	0,257142857	1,8	2,885714286	250 µg/ml	0,12222222	1,888888889	3,088888889	
	100 µg/ml	0,828571429	2,342857143	3,057142857	100 µg/ml	0,94444444	2,4	3,588888889	
	50 µg/ml	0,871428571	2,157142857	2,657142857	50 µg/ml	1,03333333	2,45555556	3,22222222	
	25 µg/ml	1,142857143	2,542857143	2,871428571	25 µg/ml	1,24444444	2,788888889	3,3	

	18 h MSSA	18 h MRSA	24 h MSSA	24 h MRSA	48 h MSSA	48 h MRSA
250 µg/ml	0,257142857	0,12222222	1,8	1,888888889	2,885714286	3,088888889
100 µg/ml	0,828571429	0,944444444	2,342857143	2,4	3,057142857	3,588888889
50 µg/ml	0,871428571	1,033333333	2,157142857	2,45555556	2,657142857	3,22222222
25 µg/ml	1,142857143	1,244444444	2,542857143	2,788888889	2,871428571	3,3

### Média da zona de inibição (cm) das estirpes de MSSA hospitalares

MSSA	18h	24h	48h
250 µg/ml	3,94375	4,06875	4,18125
100 µg/ml	4,3375	4,56875	4,80625
50 µg/ml	4,53125	4,81875	5,06875
25 µg/ml	4,55625	4,7625	5,0125
250 µg/ml	2,8875	2,95625	2,94375
100 µg/ml	2,93125	2,9875	3,00625
50 µg/ml	2,825	2,89375	3
25 µg/ml	2,9875	3,0625	3,20625
250 µg/ml	2,3625	2,44375	2,45
100 µg/ml	2,49375	2,5125	2,525
50 µg/ml	2,40625	2,43125	2,4375
25 µg/ml	2,41875	2,44375	2,45625
250 µg/ml	2,2	2,35625	2,45625
100 µg/ml	2,325	2,43125	2,61875
50 µg/ml	2,38125	2,45	2,5625
25 µg/ml	2,30625	2,375	2,575

Média da zona de inibição (cm) das estirpes de MRSA hospitalares

MRSA	18h	24h	48h
250 µg/ml	2,226666667	2,28	2,32
100 µg/ml	2,486666667	2,513333	2,546666667
50 µg/ml	2,28	2,326667	2,36
25 µg/ml	2,607692308	2,646154	2,7
250 µg/ml	2,96875	3,01875	3,0375
100 µg/ml	2,96875	3,0125	3,025
50 µg/ml	2,81875	2,85625	2,86875
25 µg/ml	2,81875	2,86875	2,95
250 µg/ml	2,49375	2,53125	2,55625
100 µg/ml	2,54375	2,5875	2,6125
50 µg/ml	2,46875	2,48125	2,4875
25 µg/ml	2,45	2,43125	2,45
250 µg/ml	0,95	0,95625	0,96875
100 µg/ml	1,0125	1,03125	1,03125
50 µg/ml	1,02	1,02	1,013333333
25 µg/ml	1,006666667	1,006667	1,006666667

Média das densidades óticas – hospitalares

MSSA	Média	18h	24h	48h	MRSA	Média	18h	24h	48h
	250 µg/ml	2,3125	2,51875	3,85625			3,2	3,58125	5,09375
100 µg/ml	2,93125	3,18125	4,4125	3,9125	4,2125	5,2875			
50 µg/ml	3,25625	3,55	4,575	4,00625	4,3625	5,11875			
25 µg/ml	3,33125	3,38125	4,76875	3,58125	4,025	4,975			

EGCG	18 h MSSA	18 h MRSA	24 h MSSA	24 h MRSA	48 h MSSA	48 h MRSA
250 µg/ml	2,3125	3,2	2,51875	3,58125	3,85625	5,09375
100 µg/ml	2,93125	3,9125	3,18125	4,2125	4,4125	5,2875
50 µg/ml	3,25625	4,00625	3,55	4,3625	4,575	5,11875
25 µg/ml	3,33125	3,58125	3,38125	4,025	4,76875	4,975

Valores de p para estirpes MSSA e MRSA da comunidade e hospitalares (18,24 e 48h)

	18h	MSSA	MRSA	24h	MSSA	MRSA	48h	MSSA	MRSA
TIMR	0,059634909	3,68632E-06	TIMR	0,098203	1,05072E-06	TIMR	0,243957	5,37003E-06	
TTMR	0,000824167	0,00056867	TTMR	0,000424	0,000416695	TTMR	0,004555	0,004149965	
TGMR	0,000423529	6,70059E-05	TGMR	0,000168	0,000242834	TGMR	0,00034	0,000734665	
TAMR	8,97111E-06	9,68885E-07	TAMR	0,009367	1,56352E-10	TAMR	0,000688	8,57114E-09	

Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com *tetraciclina* 30µg – comunidade

Fenótipo de Resistencia à Meticilina	Estirpes	Tetra 30µg	Tetra + 250 µg/ml EGCG	Tetra + 100 µg/ml EGCG	Tetra + 50 µg/ml EGCG	Tetra + 25 µg/ml EGCG
	CC3	S	S	S	S	S
<b>M</b>	CC4	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB1	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB6	S	S	S	S	S
<b>A</b>	MB10	S	S	S	S	S
	MB17	S	S	S	S	S
	5-7S	S	S	S	S	S
	MB2	S	S	S	S	S
	MB4	S	S	S	S	S
<b>M</b>	MB5	S	S	S	S	S
<b>R</b>	MB12	S	S	S	S	S
<b>S</b>	1-2S	S	S	S	S	S
<b>A</b>	VFXB7	S	S	S	S	S
	VFXB14	S	S	S	S	S
	VFXB15	S	S	S	S	S
	VFXB16	S	S	S	S	S

Antibiograma das estirpes expostas à EGCG em diferentes concentrações com *gentamicina* 30µg

Fenótipo de Resistencia à Meticilina	Estirpes	Genta 30µg	Genta + 250 µg/ml EGCG	Genta + 100 µg/ml EGCG	Genta + 50 µg/ml EGCG	Genta + 25 µg/ml EGCG
	CC3	S	S	S	S	S
<b>M</b>	CC4	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB1	S	S	S	S	S
<b>S</b>	MB6	S	S	S	S	S
<b>A</b>	MB10	S	S	S	S	S
	MB17	S	S	S	S	S
	5-7S	S	S	S	S	S
	MB2	S	S	S	S	S

	MB4	S	S	S	S	S
<b>M</b>	MB5	S	S	S	S	S
<b>R</b>	MB12	S	S	S	S	S
<b>S</b>	1-2S	S	S	S	S	S
<b>A</b>	VFXB7	S	S	S	S	S
	VFXB14	S	S	S	S	S
	VFXB15	S	S	S	S	S
	VFXB16	S	S	S	S	S

Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a amoxicilina 25µg em estirpes de MRSA de estirpes hospitalares

Fenótipo de Resistência à Metilina	Amostra biológica	Amox 25µg	Amox + 250µg/ml EGCG	Amox + 100µg/ml EGCG	Amox + 50 µg/ml EGCG	Amox + 25 µg/ml EGCG
	<b>MR1:</b> Exs.Purulento de ferida da mão	R	R	R	R	R
	<b>MR2:</b> Exs. purulento úlcera pé	R	R	R	R	R
	<b>MR3:</b> Expetoração	R	R	R	R	R
	<b>MR4:</b> Lavado bronco-alveolar	R	R	R	R	R
	<b>MR5:</b> Hemocultura	R	R	R	R	R
	<b>MR6:</b> Exs.Purulento pé	R	R	R	R	R
<b>M</b>	<b>MR7:</b> Biópsica-úlceras pressão	R	R	R	R	R
<b>R</b>	<b>MR8:</b> Exs.purulento	R	R	R	R	R
<b>S</b>	<b>MR9:</b> Hemocultura	R	R	R	R	R
<b>A</b>	<b>MR10:</b> Biópsia/fragmento tecido-amputação	R	R	R	R	R
	<b>MR11:</b> Hemocultura-catéter	R	R	R	R	R
	<b>MR12:</b> Exs. purulento aspirado-hernia inguino escrotal	R	R	R	R	R
	<b>MR13:</b> Exs. purulento-pele queimada	R	R	R	R	R
	<b>MR14:</b> Exs.ferida operatória	R	R	R	R	R
	<b>MR15:</b> Hemocultura	R	R	R	R	R
	<b>MR16:</b> Hemocultura	R	R	R	R	R

Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a tetraciclina 30µg em estirpes MSSA hospitalares

Fenótipo de Resistência à Metilina	Amostra biológica	TETRA 30µg	TETRA + 250 µg/ml EGCG	TETRA + 100 µg/ml EGCG	TETRA + 50 µg/ml EGCG	TETRA + 25 µg/ml EGCG
	MS1: Exs. Purulento ulcera pé	S	S	S	S	S
	MS2: Expectoração	S	S	S	S	S
	MS3: Exs. Purulento anca	S	S	S	S	S
	MS4: Expectoração	S	S	S	S	S
	MS5: Hemocultura	S	S	S	S	S
	MS6: Exs. Purulento pé	S	S	S	S	S
M	MS7: Expectoração	S	S	S	S	S
S	MS8: Exs. Ferida operatória - Mama	S	S	S	S	S
S	MS9: Urina	S	S	S	S	S
A	MS10: Exs. Superficial aspirado Antebraço	S	S	S	S	S
	MS11: Expectoração	S	S	S	S	S
	MS12: Expectoração	S	S	S	S	S
	MS13: Expectoração	S	S	S	S	S
	MS14: Líquido Diálise	S	S	S	S	S
	MS15: Urina	S	S	S	S	S
	MS16: Exs. Ferida oper. - Lombar	S	S	S	S	S

Avaliação de potencial sinergismo de EGCG em diferentes concentrações com a tetraciclina 30µg, em estirpes de MRSA hospitalares

Fenótipo de Resistência à Metilina	Amostra biológica	Tetra 30µg	Tetra + 250 µg/ml EGCG	Tetra + 100 µg/ml EGCG	Tetra + 50 µg/ml EGCG	Tetra + 25 µg/ml EGCG
	MR1: Exs. Purulento de ferida da mão	S	S	S	S	S
	MR2: Exs. Purulento de ulcera pé	S	S	S	S	S
	MR3: Expectoração	S	S	S	S	S
	MR4: Lavado broncoalveolar	S	S	S	S	S
	MR5: Hemocultura	S	S	S	S	S
	MR6: Exs. purulento - pé	S	S	S	S	S
M	MR7: Biópsia úlcera pressão	S	S	S	S	S
R	MR8: Exs. Purulento	S	S	S	S	S
S	MR9: Hemocultura	S	S	S	S	S
A	MR10: Biópsia/fragmento tecido - amputação	S	S	S	S	S
	MR11: Hemocultura - catéter	S	S	S	S	S
	MR12: Exs. purulento aspirado - hernia inguino-escrotal	S	S	S	S	S
	MR13: Exs. purulento zaragatoa - pele queimada	S	S	S	S	S
	MR14: Exs. Ferida operatória	S	S	S	S	S
	MR15: Hemocultura	S	S	S	S	S
	MR16: Hemocultura	S	S	S	S	S

Sinergismo de EGCG com *imipenem* 10 µg em estirpes de MSSA hospitalares.

Fenótipo de Resistencia à Metilina	Amostra biológica	Imip + 250 µg/ml EGCG	Imip + 100 µg/ml EGCG	Imip + 50 µg/ml EGCG	Imip + 25 µg/ml EGCG
	<b>MS1:</b> Exs.Purulento ulcera pé	S	S	S	S
	<b>MS2:</b> Expectoração	S	S	S	S
	<b>MS3:</b> Exs.Purulento anca	S	S	S	S
	<b>MS4:</b> Expectoração	S	S	S	S
	<b>MS5:</b> Hemocultura	S	S	S	S
	<b>MS6:</b> Exs.Purulento pé	S	S	S	S
M	<b>MS7:</b> Expectoração	S	S	S	S
s	<b>MS8:</b> Exs.Ferida operatória - Mama	S	S	S	S
s	<b>MS9:</b> Urina	S	S	S	S
A	<b>MS10:</b> Exs. Superficial aspirado Antebraço	S	S	S	S
	<b>MS11:</b> Expectoração	S	S	S	S
	<b>MS12:</b> Expectoração	S	S	S	S
	<b>MS13:</b> Expectoração	S	S	S	S
	<b>MS14:</b> Liquido Diálise	S	S	S	S
	<b>MS15:</b> Urina	S	S	S	S
	<b>MS16:</b> Exs.Ferida oper. - Lombar	S	S	S	S