

Patricia Amorim da Cunha

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ENTEROBACTÉRIAS DE PACIENTES, PROFISSIONAIS DA
SAÚDE E AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Patricia Amorim da Cunha
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
DE PACIENTES, PROFISSIONAIS DA SAÚDE E AMBIENTE
HOSPITALAR / Patricia Amorim da Cunha Cunha ;
orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, 2017.
157 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

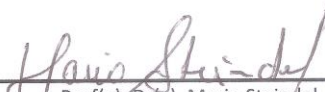
1. Biotecnologia e Biociências. I. Cristine
Marques Sincero, Thaís. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Identificação e caracterização de enterobactérias de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar”

Por

Patrícia Amorim da Cunha

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

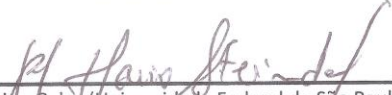


Prof(a). Dr(a). Mario Steindel
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Thais Cristine Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Ana Cristina Gales (Universidade Federal de São Paulo)



Dr(a) Glauber Wagner (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carlos R. Zarate-Blades (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 04 de maio de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os pacientes e profissionais de saúde que, gentilmente, forneceram as amostras desse estudo e despenderam parte do seu tempo para responder aos questionários.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências e aos seus docentes, que foram de extrema importância para o meu aprendizado e sempre estimularam o desenvolvimento de um raciocínio crítico.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pela concessão de bolsa. À empresa Neoprospecta Microbiome Technologies, pelo apoio financeiro e infraestrutura fornecida.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Thaís C. Marques Sincero, por quem tenho grande admiração e gratidão. Confiou a mim este projeto e me ensinou muito sobre microbiologia, um tema bastante desafiador para mim.

Agradeço imensamente à minha amiga e coorientadora MSc. Aline F. R. Sereia. Quem, há muitos anos, é uma inspiração para mim e por quem possuo grande admiração. Quem foi a principal responsável pela elaboração do projeto HAIMP (*Health-care Associated Microbime Project*), no qual esse trabalho está inserido. Sou muito grata por toda a sua dedicação, paciência, parceria e confiança.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), Dra. Ivete Masukawa, Enf. Gilson B. Vieira e Enfa. Taíse C. R. Klein, que teve uma enorme colaboração nesse estudo, por ter auxiliado nas coletas de amostras de todos os pacientes. Às chefias de enfermagem das unidades hospitalares que participaram do estudo. Ao Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas, Mara C. Scheffer, Clarice Iomara e Maria Luiza Vieira, pelo auxílio fornecido no uso do equipamento Vitek2[®].

Ao laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) da UFSC e a todas as meninas que também participaram dessa jornada: MSc. Daniela Tartari, MSc. Caetana Zamparette, MSc. Alejandra D. Estigarribia, MSc. Suellen Gavronski e Paula Fragosó.

A todos da empresa Neoprospecta, à equipe de laboratório, pelo auxílio nos procedimentos e à equipe de bioinformática, por terem realizado as análises de sequenciamento. Ao Dr. Luiz Felipe V. de Oliveira, com quem aprendi muito e é uma grande inspiração profissional e científica.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia, ao Dr. Alessandro Conrado de O. Silveira e à MSc. Eleine Kuroki Anzai, pela identificação de alguns isolados no equipamento Vitek MS (MALDI-TOF).

À Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Gales e ao laboratório ALERTA da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo fornecimento de controles positivos dos genes de resistência analisados.

Aos meus pais e irmãos, que nunca deixaram de me apoiar nas minhas decisões e que me dão todo suporte necessário para que eu consiga seguir com meus sonhos. Em nenhum momento mediram esforços para me ajudar, sinto-me muito privilegiada por tê-los tão próximos.

A todos os amigos e amigas que me acompanharam durante essa longa trajetória.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

(Marie Curie)

RESUMO

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* estão entre os microorganismos de maior relevância nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), devido à alta prevalência e à facilidade de adquirir e transmitir genes de resistência aos antimicrobianos. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar enterobactérias coletadas entre abril-setembro/2015 no HU-UFSC. Um total de 180 pontos de coleta foram monitorados mensalmente em cinco unidades hospitalares, incluindo pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar, o que totalizou 1.080 amostras, que foram semeadas em ágar MacConkey. Obteve-se 210 amostras positivas para enterobactérias (76,9%) e 284 isolados. Os isolados foram identificados por método automatizado (Vitek2[®]) e sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA (MiSeq System, Illumina). MALDI-TOF (Vitek MS) e sequenciamento do gene *rpoB* também foram aplicados para alguns isolados. A resistência das enterobactérias foi determinada pelo TSA (Vitek2[®]) e pela pesquisa de genes codificadores de β -lactamases (qPCR). As maiores proporções de amostras positivas foram em pacientes (44,4%), seguidas de ambiente (16,1%) e profissionais (6,9%). As maiores taxas foram nos *swabs* retais dos pacientes (89,4%) e nas áreas de repouso e alimentação dos profissionais (40,5%). Os métodos de identificação Vitek2[®] e 16S rRNA tiveram excelente concordância a nível de gênero (82,8%) e de espécie (90,8%), apesar de algumas discordâncias, principalmente para o gênero *Enterobacter spp.*, que foi melhor identificado pelo *rpoB*. As enterobactérias mais abundantes foram *E. coli* (20,1%), *K. pneumoniae* (19,4%), *Pantoea spp.* (19%) e *E. cloacae complex* (17,3%). Um total de 35% das enterobactérias foram classificadas como MDR, 30,9% foram resistentes às cefalosporinas de espectro estendido (ESC-R) e 14,5% resistentes aos carbapenêmicos (CARB-R). O gene de resistência mais frequente foi *bla*_{SHV} (20,1%), seguido de *bla*_{CTX-M-1} (10,2%), *bla*_{CTX-M-8} (8,7%), *bla*_{CTX-M-9} (4,6%), *bla*_{KPC} (4,6%) e *bla*_{CTX-M-2} (0,4%). A distribuição de bactérias MDR, ESC-R e CARB-R foi homogênea entre pacientes, profissionais e ambiente, indicando ampla disseminação pelo hospital. Esse estudo contribuiu com informações relevantes sobre a distribuição, abundância e caracterização do perfil de resistência das enterobactérias circulantes no HU-UFSC, podendo ser utilizado para o delineamento de novas estratégias para redução de IRAS.

Palavras-chave: IRAS, *Enterobacteriaceae*; Estudo de Rastreamento, Resistência Antimicrobiana; Identificação microbiológica.

ABSTRACT

Some of the most concerning microorganisms found in HAI (Healthcare Associated Infections) belong to the *Enterobacteriaceae* family, due to their high prevalence and risk of acquiring resistance genes. The aim of this study was to identify and characterize enterobacteria collected between Apr-Sep/2015 at HU-UFSC. Monthly, a total of 180 collection points were monitored in five hospital units, including samples from patients (PT), healthcare workers (HCW) and hospital environment (HEV). The 1,080 samples were seeded in MacConkey agar. A total of 210 samples were positive for enterobacteria (76.9%) and 284 isolates were obtained. The isolates were identified by an automated system (Vitek2[®]) and by 16S rRNA sequencing (MiSeq System, Illumina). MALDI-TOF (Vitek[®] MS) and *rpoB* sequencing were also applied for some isolates. The resistance profile was determined by AST (Vitek2[®]) and by the presence of β -lactamases encoding genes (qPCR). The samples that presented higher proportion of enterobacteria were from PT (44.4%), followed by HEV (16.1%) and HCW (6.9%). The highest rates were from PT rectal swabs (89.4%) and rest/dinning areas of the HCW (40.5%). The identification methods Vitek2[®] and 16S rRNA presented excellent concordance rates at genera (82.8%) and species level (90.8%). Although there were some discordances, especially for *Enterobacter spp.*, that was better identified by the *rpoB* gene. The most abundant enterobacteria were *E. coli* (20.1%), *K. pneumoniae* (19.4%), *Pantoea spp.* (19%) and *E. cloacae complex* (17.3%). A total of 35% of the enterobacteria were classified as multi-drug resistant (MDR), 30.9% were resistant to extended spectrum cephalosporins (ESC-R) and 14.5% were resistant to carbapenems (CARB-R). The most frequent resistance gene was *bla*_{SHV} (20.1%), followed by *bla*_{CTX-M-1} (10.2%), *bla*_{CTX-M-8} (8.7%), *bla*_{CTX-M-9} (4.6%), *bla*_{KPC} (4.6%) and *bla*_{CTX-M-2} (0.4%). The MDR, ESC-R and CARB-R enterobacteria distribution was homogeneous between PT, HCW and HEV, highlighting their wide distribution in the hospital. This study gave relevant information about the distribution, abundance and resistance profile of the HU-UFSC circulating enterobacteria. These findings could play an important role in developing new strategies for HAI control.

Keywords: HAI, *Enterobacteriaceae*, Antimicrobial resistance, Microbial identification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema de classificação das principais enzimas β -lactamases encontradas em *Enterobacteriaceae*.....39
- Figura 2 – Enterobactérias obtidas de amostras coletadas entre abril-setembro/2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC. Quantidade de pontos de coleta, proporção de amostras positivas (positividade) e quantidade de isolados obtidos. Distribuição por fonte de coleta (pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar).....57
- Figura 3: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.....60
- Figura 4: Enterobactérias obtidas de amostras coletadas entre abril-setembro/2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC. Quantidade de pontos de coleta, proporção de amostras positivas (positividade) e quantidade de isolados obtidos. Distribuição por unidade hospitalar.....62
- Figura 5: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na unidade de atendimento de emergência (EMG). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.....65
- Figura 6: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Clínica Cirúrgica I (CRI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.....66
- Figura 7: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Clínica Médica I (CMI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.....67
- Figura 8: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em

| | |
|--|-----|
| pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar..... | 68 |
| Figura 9: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> no Centro Cirúrgico (CC). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar..... | 69 |
| Figura 10: Distribuição da abundância de enterobactérias identificadas no HU-UFSC por sítio de coleta..... | 93 |
| Figura 11: Distribuição da abundância de enterobactérias identificadas no HU-UFSC por unidade hospitalar..... | 95 |
| Figura 12: Perfil fenotípico de resistência das enterobactérias aos antimicrobianos..... | 99 |
| Figura 13: Frequência observada dos diferentes genes de resistência a antimicrobianos testados em <i>Enterobacteriaceae</i> (N = 284)..... | 106 |
| Figura 14: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência..... | 108 |
| Figura 15: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em <i>E. cloacae complex</i> . Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência..... | 109 |
| Figura 16: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em <i>E. coli</i> . Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência..... | 108 |
| Figura 17: Comparação do perfil fenotípico e genotípico de resistência antimicrobiana das enterobactérias..... | 110 |
| Figura 18: Distribuição e proporções de enterobactérias MDR nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar..... | 116 |

Figura 19: Distribuição e proporções de enterobactérias ESC-R (resistentes às cefalosporinas de espectro estendido) nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.....117

Figura 20: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para o gene *bla_{SHV}* nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.....118

Figura 21: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para algum gene *bla_{CTX-M}* nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.....119

Figura 22: Distribuição e proporções de enterobactérias CARB-R (resistentes a carbapenêmicos) nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.....120

Figura 23: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para o gene *bla_{KPC}* nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.....121

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Descrição e distribuição dos pontos de coleta por unidade hospitalar e por fonte de coleta das amostras coletadas pelo projeto HAIMP entre abril-setembro/2015..... | 46 |
| Tabela 2: Identificação fenotípica (Vitek2 [®]) e genotípica (sequenciamento 16S rRNA) dos isolados de enterobactérias obtidos de abril a setembro de 2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC..... | 72 |
| Tabela 3: Matriz de concordância entre identificação pelo sistema Vitek2 [®] e sequenciamento do marcador 16S rRNA a nível de espécie..... | 82 |
| Tabela 4: Matriz de concordância entre identificação pelo sistema Vitek2 [®] e sequenciamento do marcador 16S rRNA a nível de gênero..... | 83 |
| Tabela 5: Identificação fenotípica realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF - Vitek [®] MS) dos isolados de <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 86 |
| Tabela 6: Identificação genotípica realizada por sequenciamento do gene <i>rpoB</i> . dos isolados de <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 87 |
| Tabela 7: Perfil de resistência das principais enterobactérias aos antimicrobianos: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. cloacae complex</i> . Quantidade de isolados resistentes a cada antimicrobiano e a sua distribuição em pacientes e profissionais da saúde/ambiente hospitalar..... | 100 |
| Tabela 8: Perfil fenotípico e genotípico de resistência das enterobactérias aos antimicrobianos e sua distribuição por unidade hospitalar. | 121 |
| Tabela 9: Correlação dos resultados obtidos para os isolados de enterobactérias com dados clínicos do projeto HAIMP..... | 124 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB - Ambiente Hospitalar

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - *Brain-heart infusion*

BKC - *Brazilian Klebsiella Carbapenemase*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CARB - Antimicrobianos Carbapenêmicos

CARB-R - Resistência aos Carbapenêmicos

CC - Centro Cirúrgico

CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEP-UFSC - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC

CESP - *Citrobacter spp., Enterobacter spp., Serratia spp., Providencia spp.*

CMI - Clínica Médica I

CRI - Clínica Cirúrgica I

CTX-M - Cefotaximase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

EMG - Unidade de Emergência

ESBL - β -lactamases de amplo espectro

ESC - Cefalosporinas de Espectro Estendido

ESC-R - Resistência às Cefalosporinas de Espectro Estendido

EUA - Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

FISH - *Fluorescent in situ Hybridization*

HAIMP - *Health-Care Associated Infection Microbiome Project*

HU/UFSC - Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

IBL - Inibidor de β -lactamase

IMP - Imipenemase Metallo- β -lactamase

IRAS - Infecção Relacionada à Assistência à Saúde

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LB - Luria Bertani

LCA - *Least Common Ancestor*

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization– Time Of Flight*

MDR - *Multidrug resistant*

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MLSA – *Multilocus Sequence Analysis*

MS - *Mass Spectrometry*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NDM - *New Delhi Metallo- β -lactamase*

NSBL - β -lactamases de espectro estreito

OMS - Organização Mundial de Saúde

OTU - Unidade Taxonômica Operacional

OXA - Oxacilinase

PBP - *Penicillin-binding Proteins*

PCIRAS - Programas de Controle e Prevenção de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

PNPCIRAS - Programa Nacional de Prevenção e Controle das Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCT - Pacientes

PDR - *Pandrug resistant*

PRF - Profissionais de Saúde

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

SHV - *Sulphydryl Variable*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEM - Temoniera

TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VIM - *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*

VK - VITEK

XDR - *Extensive Drug Resistance*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. REVISÃO DE LITERATURA..... | 25 |
| 1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)..... | 25 |
| 1.1.1 Epidemiologia das IRAS | 25 |
| 1.1.2 Programas de Prevenção e Controle de IRAS | 26 |
| 1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DAS IRAS..... | 27 |
| 1.2.1 Família Enterobacteriaceae..... | 28 |
| 1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA..... | 28 |
| 1.3.1 Origem e Disseminação da Resistência Antimicrobiana | 29 |
| 1.4 RESISTÊNCIA EM GRAM-NEGATIVOS E ENTEROBACTERIACEAE..... | 30 |
| 1.4.1 Agentes Anti-Gram-negativos e Mecanismos de Resistência..... | 31 |
| 1.4.1.1 β -lactamases..... | 32 |
| 1.4.1.1.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)..... | 33 |
| 1.4.1.1.2 Carbapenemases | 35 |
| 1.4.1.1.2.1 Carbapenemases de classe A..... | 35 |
| 1.4.1.1.2.2 Carbapenemases de classe B | 36 |
| 1.4.1.1.2.3 Carbapenemases de classe D..... | 37 |
| 1.5 MÉTODOS PARA ESTUDOS DE INFECÇÕES | 38 |
| 1.5.1 Identificação Bacteriana | 40 |
| 1.5.2 Caracterização do Perfil de Resistência a Antimicrobianos.... | 42 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 45 |
| 3. OBJETIVOS..... | 46 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 46 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 46 |
| 4. METODOLOGIA | 47 |
| 4.1 PROJETO HAIMP | 47 |
| 4.2 COLETAS DAS AMOSTRAS..... | 47 |
| 4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS | 49 |
| 4.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA | 49 |
| 4.4.1 Identificação Fenotípica..... | 49 |
| 4.4.1.1 Sistema Vitek2 [®] | 49 |
| 4.4.1.2 MALDI-TOF..... | 50 |
| 4.4.2 Identificação Genotípica | 51 |
| 4.4.2.1 Sequenciamento de Marcadores Moleculares | 51 |
| 4.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 52 |
| 4.5.1 Análise do Fenótipo de Resistência aos Antimicrobianos | 52 |
| 4.5.2 Análise do Perfil Genotípico de Resistência aos Antimicrobianos | 53 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 53 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 5.1 | DISTRIBUIÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS | 56 |
| 5.1.1 | Distribuição de Enterobactérias por Fonte de Coleta | 56 |
| 5.1.2 | Distribuição de Enterobactérias por Unidade Hospitalar | 61 |
| 5.2 | IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA..... | 70 |
| 5.2.1 | Identificação Vitek2 [®] e 16S rRNA | 70 |
| 5.2.1.1 | Análise de Concordância - Vitek2 [®] vs. 16S rRNA | 83 |
| 5.2.2 | Identificação MALDI-TOF..... | 88 |
| 5.2.3 | Identificação rpoB..... | 89 |
| 5.3 | ABUNDÂNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS..... | 90 |
| 5.3.1 | Abundância de Enterobactérias Por Fonte de Coleta | 91 |
| 5.3.2 | Abundância de Enterobactérias Por Unidade Hospitalar | 94 |
| 5.4 | PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 96 |
| 5.4.1 | TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos | 96 |
| 5.4.2 | Detecção de genes codificadores de β -lactamases | 104 |
| 5.4.3 | Comparação entre Perfil Fenotípico e Genotípico de Resistência | 111 |
| 5.5 | DISTRIBUIÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES 114 | |
| 5.5.1 | Distribuição das Enterobactérias Resistentes por Fonte de Coleta | 114 |
| 5.5.2 | Distribuição das Enterobactérias Resistentes por Unidade Hospitalar..... | 122 |
| 5.6 | CORRELAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS | 124 |
| 6. | SUMÁRIO DE RESULTADOS | 130 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 133 |
| 8. | PERSPECTIVAS..... | 134 |
| 9. | REFERÊNCIAS | 135 |
| | APÊNDICE A | 143 |
| | APÊNDICE B | 145 |
| | APÊNDICE C | 147 |
| | APÊNDICE D..... | 150 |

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são qualquer infecção adquirida pelo paciente durante a prestação de algum serviço de saúde. Esse termo surgiu em meados da década de 1990 para ampliar o conceito de “infecções hospitalares”, que passou a incorporar as infecções relacionadas à assistência à saúde em qualquer ambiente. Diferentes termos que podem ser utilizados para se referir às IRAS são “infecções nosocomiais” ou “institucionais” (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; WHO, 2016).

As IRAS são o evento adverso mais comum nas instituições de saúde, constituindo uma das principais ameaças à segurança dos pacientes. Os impactos causados por essas infecções podem resultar em um tempo maior de internação, elevando os gastos financeiros dos sistemas de saúde e gerando um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, além de causarem muitas mortes desnecessárias. Outra consequência é o aumento da resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (PITTET *et al.*, 2008; WHO, 2011).

Alguns determinantes comuns das IRAS são: o uso de dispositivos invasivos e antimicrobianos; procedimentos diagnósticos e terapêuticos de alto risco; imunossupressão ou outras condições severas de saúde, principalmente afetando recém-nascidos e idosos; e a falta de medidas de prevenção e controle de IRAS (WHO, 2016).

1.1.1 Epidemiologia das IRAS

As IRAS são consideradas um grande problema de saúde pública, seu controle e prevenção são um dos principais desafios mundiais. Nenhum país ou sistema de saúde, até mesmo os mais desenvolvidos e sofisticados podem dizer que estão livres desse problema. Estima-se que a cada ano, centenas de milhões de pacientes ao redor do mundo adquiram alguma IRAS (PITTET *et al.*, 2008; WHO, 2016). O risco é de duas a 20 vezes maior em países em desenvolvimento, onde a proporção de pacientes infectados frequentemente excede 25% (WHO, 2005). Alguns fatores que contribuem para esse cenário são a escassez e a baixa qualificação de recursos humanos, aliados à estrutura física inadequada em serviços de saúde e ao desconhecimento ou não cumprimento de medidas de controle de IRAS (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Apesar da grande relevância das IRAS para a saúde pública, há uma grande dificuldade em se coletar dados fidedignos que ajudem a entender a sua epidemiologia global, nacional e regional. Muitos países não possuem um sistema de vigilância para IRAS, e aqueles que possuem, precisam lidar com a complexidade e a falta de critérios uniformes para o seu diagnóstico. Os programas de vigilância de IRAS requerem tempo e recursos, além de exigirem grande conhecimento para o desenho do estudo, coleta, análise e interpretação dos dados (ALLEGIANZI et al., 2011).

Pela primeira vez, em 2011, a Organização das Nações Unidas (ONU) realizou um mapeamento global de IRAS por meio de uma revisão sistemática de trabalhos científicos publicados entre os anos de 1995 e 2010. Dentre os países em desenvolvimento, o Brasil foi um dos que apresentou o maior número de publicações. Calculou-se uma prevalência de IRAS de 3,6-12% em países desenvolvidos e 5,7-19,1% em países em desenvolvimento. No Brasil, foi estimada uma prevalência de 14%. Verificou-se que o risco de se adquirir IRAS é significativamente maior em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), com aproximadamente 30% dos pacientes sendo afetados por pelo menos um episódio de IRAS e apresentando considerável morbidade e mortalidade associadas (WHO, 2011).

1.1.2 Programas de Prevenção e Controle de IRAS

Grande parte das IRAS poderiam ser completamente evitadas pela adoção de medidas de prevenção e controle (WHO, 2016). Uma das primeiras medidas, adotada por volta do ano de 1850, foi a lavagem de mãos antes e entre contato com os pacientes, porém, os primeiros programas específicos de controle e prevenção de IRAS (PCIRAS) só tiveram início em meados do século XX nos Estados Unidos. No Brasil, durante a década de 1970 foram criadas as primeiras Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIHs), que passaram a ser obrigatórias para todos os hospitais brasileiros a partir de 1983, com a publicação da Portaria nº 196/83 pelo Ministério da Saúde (OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2016). Em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que passou a ser responsável por definir as normas gerais, os critérios e os métodos para a prevenção e controle das IRAS no Brasil, coordenando as ações e estabelecendo um sistema de avaliação e divulgação dos indicadores nacionais (ANVISA, 2013).

Há fortes evidências de que a implementação de medidas de PCIRAS levam a uma redução significativa nos casos de IRAS e nos danos ao paciente. Observa-se resultados ainda melhores quando essas

medidas são associadas a um suporte político e administrativo integrados com serviços clínicos e com a cultura de segurança do paciente. A implementação de programas efetivos de PCIRAS podem levar a uma redução de mais de 30% nas taxas de IRAS (WHO, 2016).

Algumas das ações estratégicas que são propostas para a redução de IRAS a níveis evitáveis são: (1) adesão às práticas baseadas em evidências, educando, implementando e realizando investimentos; (2) aumentar a sustentabilidade por meio de incentivos financeiros e reinvestimento em estratégias que demonstrarem sucesso; (3) preencher as lacunas de conhecimento para responder a ameaças emergentes por meio de pesquisas básicas, epidemiológicas e translacionais; (4) coletar dados para direcionar esforços de prevenção e mensurar os progressos (CARDO *et al.*, 2010; OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2016).

No Brasil, o último Programa Nacional de Prevenção e Controle das Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) foi publicado em 2016 e terá um período de vigência de cinco anos (2016-2020). Dentre os objetivos específicos estão: (1) Consolidar o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das IRAS; (2) Reduzir nacionalmente a incidência das IRAS prioritárias; (3) Prevenir e controlar a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde; (4) Consolidar o PNPCIRAS (ANVISA, 2016).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DAS IRAS

As IRAS podem ser causadas por agentes infecciosos de origem endógena ou exógena. As fontes endógenas são bactérias que colonizam diversos sítios corpóreos como: pele, nariz, boca, trato gastrointestinal ou vagina, que são locais normalmente colonizados por micro-organismos. Esses micro-organismos podem se tornar invasivos sob certas condições favoráveis ou podem causar infecção pela contaminação de sítios estéreis. As fontes exógenas são aquelas externas ao paciente, tais como profissionais da saúde, visitantes, equipamentos hospitalares, instrumentos médicos ou ambiente hospitalar (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

Alguns dos micro-organismos de maior relevância para IRAS, tanto em hospitais de países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* (MAGIORAKOS *et al.*, 2011; RICE, 2008). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, os bacilos Gram-negativos são os mais comumente encontrados (ALLEGIANZI *et al.*, 2011). As infecções

mais frequentes são as de urina, intra-abdominais, de corrente sanguínea e de feridas cirúrgicas (WHO, 2016).

1.2.1 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* foi descrita por Rahn em 1937, esse nome foi derivado da palavra em latim "*enterobacterium*", que significa "bactéria intestinal". Essa é a única família representante da ordem Enterobacteriales, da classe Gammaproteobacteria e do filo Proteobacteria. Os micro-organismos membros dessa família podem ser chamados de "enterobactérias" ou "bactérias entéricas", pois muitos deles fazem parte da microbiota intestinal de animais. Atualmente estão descritos 53 gêneros pertencentes a essa família, com mais de 170 espécies identificadas, entretanto, somente 26 gêneros são associados a infecções em humanos (LPSN, 2017; RAHN, 1937).

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos, fermentadores de glicose e anaeróbios facultativos, podem ser encontradas no solo, na água, em plantas e em animais (de insetos a humanos) (BRENNER, 1984).

Muitas das enterobactérias são consideradas patógenos oportunistas, sendo responsáveis por inúmeros casos de infecções comunitárias e de IRAS. A *Escherichia coli* é frequentemente associada a infecções do trato urinário, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* são frequentemente associadas a pneumonias nosocomiais, principalmente em pacientes internados por um período prolongado. De maneira geral, todas as enterobactérias têm sido relacionadas com infecções da corrente sanguínea, periodontites, colangites e outras infecções intra-abdominais. Além destes, organismos como *Salmonella* são causadores de gastroenterites, podendo levar a uma infecção invasiva em alguns pacientes (LIVERMORE, 2012; LUPO *et al.*, 2013; PATERSON, 2006).

1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A descoberta das bactérias como agentes infecciosos se deu no fim do século XIX, entretanto, os antimicrobianos - que foram os primeiros tratamentos a apresentarem sucesso contra esses micro-organismos - só foram descobertos e introduzidos meio século depois. Esses medicamentos revolucionaram a medicina em diversos aspectos, porém, seu uso foi acompanhado do rápido aparecimento de cepas resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência antimicrobiana é um dos maiores agravantes das IRAS e constitui um dos principais problemas de saúde pública.

Infecções por bactérias resistentes a diversos tipos e classes de antimicrobianos têm se tornado cada vez mais comuns. A perda da eficácia desses antimicrobianos limita as opções terapêuticas, forçando os profissionais de saúde a prescreverem antimicrobianos que podem ser mais tóxicos para o paciente, mais caros e menos efetivos. Mesmo quando tratamentos alternativos existem, observa-se que pacientes com infecções causadas por micro-organismos resistentes apresentam um maior tempo de internação, recuperação mais lenta, incapacidade de longo prazo e maior mortalidade (CDC, 2013).

1.3.1 Origem e Disseminação da Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é o resultado de um conjunto de possíveis fatores, dentre eles estão: (1) as interações complexas entre bactérias patogênicas e não patogênicas; (2) a ação de genes de resistência; e (3) a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, por meio da subutilização, uso excessivo e mau uso desses agentes (tanto na medicina humana como animal) (DAVIES & DAVIES 2010; GUIDRY et al. 2015).

As bactérias apresentam uma surpreendente habilidade de gerar, adquirir e transmitir elementos genéticos responsáveis pela resistência antimicrobiana, que pode se dar via transformação, conjugação, transdução e mutação. A resistência pode ser amplamente disseminada por diversos meios. Genes de resistência são comumente encontrados em plasmídeos, que são facilmente compartilhados entre bactérias Gram-negativas, como as enterobactérias. Esse compartilhamento de genes de resistência pode ocorrer dentro de um hospedeiro ou no ambiente. Um dos desafios para o controle das infecções causadas por micro-organismos resistentes é que a disseminação e a aquisição de fatores de resistência pode ser silenciosa. Um exemplo são as enterobactérias, que fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal. Indivíduos podem ser colonizados e, de forma assintomática, servirem como repositório desses micro-organismos resistentes, que eventualmente, podem causar infecção (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

Dentro do contexto hospitalar, a resistência pode ser originada e transmitida por diferentes meios: (1) pode já estar presente na microbiota do paciente; (2) pode ser originada da pressão de seleção exercida pelo uso de antimicrobianos; (3) ou pode ser transmitida entre pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar (GUIDRY *et al.*, 2015).

Alguns fatores de risco para adquirir micro-organismos com determinados fatores de resistência são: uso anterior ou recente de antimicrobianos; longo tempo de internação; admissão em UTI; uso de dispositivos médicos invasivos; estado funcional comprometido; idade avançada; recebimento de transplantes; etc. (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

Medidas de prevenção que podem ser tomadas são a implementação de programas de controle de infecção e de uso racional de antimicrobianos (em inglês, *antimicrobial stewardship*), além de uma vigilância ativa que vise interromper a cadeia de transmissão. Outros fatores importantes são a educação continuada dos profissionais de saúde sobre a problemática da resistência antimicrobiana e o compartilhamento de informações sobre a epidemiologia regional, nacional e internacional (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

1.4 RESISTÊNCIA EM GRAM-NEGATIVOS E *ENTEROBACTERIACEAE*

Um aumento de resistência tem sido observado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tanto em infecções comunitárias quanto nas IRAS. Entretanto, dentre todos os problemas de resistência antimicrobiana, a resistência em bactérias Gram-negativas, como as enterobactérias, são particularmente preocupantes, pois o fenótipo resultante é resistente a quase todos os fármacos utilizados para tratamento. Isso também acontece, mas não na mesma escala, com alguns micro-organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus* e *Enterococcus* (CDC, 2013).

A característica que mais define as bactérias Gram-negativas, diferenciando-as das Gram-positivas, é a presença de uma parede celular com membrana dupla. A membrana externa evita a entrada de moléculas grandes ou hidrofóbicas e torna mais lenta a entrada de fármacos através da membrana. Há diferentes métodos pelos quais as bactérias Gram-negativas desenvolvem resistência aos antimicrobianos: (1) produção de enzimas que destroem a integridade dos antimicrobianos, como β -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; (2) mutações em sítios de ligação de antimicrobianos, que é o mecanismo mais frequente na resistência à fluoroquinolona; (3) alteração de proteínas da membrana externa ou porinas, resultando em menor permeabilidade; (4) bombas de efluxo que reduzem a concentração intracelular de moléculas anfipáticas (inclusive antimicrobianos) pela membrana, bombeando-os novamente para fora da célula (mecanismo mais encontrado em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*). Essa combinação

entre redução da permeabilidade e a presença das bombas de efluxo explicam porque as bactérias Gram-negativas são inerentemente mais resistentes que as Gram-positivas (HO; TAMBYAH; PATERSON, 2010; LIVERMORE, 2012).

1.4.1 Agentes Anti-Gram-negativos e Mecanismos de Resistência aos β -lactâmicos

Os primeiros antimicrobianos com espectro contra Gram-negativos foram as sulfonamidas, introduzidas na década de 1930. As tetraciclina, os aminoglicosídeos de primeira geração e o cloranfenicol só se tornaram disponíveis no final da década de 1940 e início da de 1950. Depois disso, seguiram-se dois grandes avanços no desenvolvimento de antimicrobianos. O primeiro foi no início da década de 1960, com o desenvolvimento das penicilinas semissintéticas e das cefalosporinas de primeira geração, juntamente com aminoglicosídeos mais potentes e menos tóxicos. O segundo avanço foi na década de 1980, que levou ao desenvolvimento das oximino-cefalosporinas de terceira e quarta geração (cefalosporinas de espectro estendido), combinações com inibidores de β -lactamases, carbapenêmicos e fluoroquinolonas (LIVERMORE, 2012). As polimixinas (colistina e polimixina B) foram descobertas no final da década de 1940, mas foram subsequentemente substituídas por agentes menos nefrotóxicos. Entretanto, nos últimos anos esses antimicrobianos têm se tornado uma opção terapêutica importante para micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos (HO; TAMBYAH; PATERSON, 2010).

O grupo de antimicrobianos β -lactâmicos, que inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, está dentro a classe dos melhores agentes antimicrobianos com importância clínica e são amplamente utilizados. O alvo dos β -lactâmicos é a biossíntese de peptidoglicano na célula bacteriana, o que leva à inibição da síntese da parede celular. Diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos são responsáveis pela resistência bacteriana a esses agentes (DAVIES; DAVIES, 2010; LIVERMORE, 2012).

Em enterobactérias, a resistência aos β -lactâmicos pode se dar por mutações nas PBP (do inglês, *Penicillin-binding Proteins*), por redução da permeabilidade da parede celular (causada pela ruptura das proteínas da membrana externa) ou pela produção de β -lactamases, que é o mecanismo de resistência mais frequentemente encontrado nessa família de bactérias (HAWKEY; JONES, 2009).

1.4.1.1 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas periplasmáticas capazes de inativar os antimicrobianos β -lactâmicos por meio da hidrólise do anel β -lactâmico. Um fator que as torna ainda mais preocupantes é que a maioria dos genes que produzem essas enzimas estão localizados em plasmídeos, podendo ser facilmente disseminados entre as bactérias (BUSH; JACOBY, 2010; LUPO *et al.*, 2013).

Com base na resistência aos β -lactâmicos e aos seus inibidores, pode-se categorizar as β -lactamases em vários fenótipos de resistência, alguns deles são:

- β -lactamases de espectro restrito (NSBL, do inglês “*Narrow Spectrum β -lactamases*”), que degradam penicilinas de forma eficiente, mas são suscetíveis a outras classes de β -lactâmicos. Entretanto, algumas mutações podem resultar na sua superexpressão, conferindo resistência a outras classes de β -lactâmicos. Ex.: TEM-1 (Temoniera-1), SHV-1 (*Sulphydryl Variable-1*).
- β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês “*Extended Spectrum β -lactamases*”), que apresentam uma ampla atividade hidrolítica a diferentes gerações de cefalosporinas. Ex.: TEM-3, SHV-2 e as do grupo CTX-M (cefotaximases).
- Carbapenemases (CARB), que são as β -lactamases com piores implicações clínicas, já que degradam carbapenêmicos, a classe de β -lactâmicos mais potente atualmente. Algumas dessas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar qualquer β -lactâmico (KIIRU *et al.*, 2012). Ex.: KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48.

Existem dois sistemas comumente usados para classificar as β -lactamases: a classificação molecular (AMBLER *et al.*, 1991) e a classificação funcional (BUSH; JACOBY, 2010). A classificação molecular é baseada na sequência de aminoácidos e divide as β -lactamases em 4 classes. As classes A, C e D utilizam serina para hidrolisar os β -lactâmicos e a classe B (metaloenzimas) requer íons de zinco divalentes como substrato de hidrólise.

A classificação funcional leva em consideração os substratos e os perfis de inibição, incluindo:

- Grupo 1 (classe C) que tem cefalosporinas como substrato e não são inibidas por ácido clavulânico. Ex.: AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, etc.

- Grupo 2 (classes A e D) que tem como substratos: penicilinas, cefalosporinas de primeira geração, cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos, carbapenêmicos, entre outros. Algumas podem ser inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. Ex.: enzimas dos grupos TEM, SHV, CTX-M, OXA, KPC, etc.
- Grupo 3 (classe B) que apresentam carbapenêmicos como substrato e podem ser inibidas por EDTA. Ex.: metalo- β -lactamases como IMP, VIM, NDM, etc. (BUSH; JACOBY, 2010).

Na figura 1 estão descritos os tipos de β -lactamases mais comumente encontradas em *Enterobacteriaceae*, com suas respectivas classificações e atividades.

Quando lançadas, as cefalosporinas de terceira geração eram quase que universalmente ativas contra as enterobactérias. Esses fármacos têm como alvo um grande espectro de patógenos, possuem baixa toxicidade e apresentam uma farmacocinética e farmacodinâmica favoráveis (LUPO, 2013). A resistência a essa classe de antimicrobiano foi observada primeiramente em *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* e *Serratia spp.*, todas expressando β -lactamases do tipo AmpC (classe C), codificadas por genes cromossomais. Esses genes foram transmitidos dos cromossomos de *Citrobacter*, e de outros gêneros, para plasmídeos e atualmente circulam em *E. coli* e *K. pneumoniae* (LIVERMORE, 2012).

1.4.1.1.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês “*Extended-Spectrum β -lactamases*”) são enzimas geralmente codificadas por plasmídeos que representam a segunda maior ameaça ao tratamento por oximino-cefalosporinas. Elas são classificadas como β -lactamases de classe A (com exceção de algumas oxacilinas, que são de classe D) e afetam as cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima) e quarta geração (cefepima e cefpiroma). Até o momento, mais de 430 ESBL foram caracterizadas e suas prevalências diferem entre grupos de pacientes e de acordo com características geográficas e clínicas (LIVERMORE, 2012).

As primeiras ESBLs, identificadas na década de 1980, são mutantes das penicilinas TEM e SHV, que foram disseminadas em *E. coli* e em outras enterobactérias nas décadas de 1960 e 1970. Embora as cefalosporinas de terceira geração sejam estáveis às enzimas TEM-1/2 e SHV-1, mais de 200 mutantes já foram identificadas. A primeira SHV

considerada ESBL (SHV-2) foi descrita em 1983 em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Serratia marcescens*. Uma única substituição de aminoácido alterou o espectro de atividade da SHV-1, permitindo a degradação de cefalosporinas de espectro estendido. Há diversas variantes descritas, como: SHV-2, -5, -11 e -12 e TEM-3, -10, -26, -52 e -116, que estão amplamente distribuídas em vários países. As ESBLs TEM e SHV tiveram ampla distribuição durante a década de 1980 e 1990, principalmente em *Klebsiella spp.* encontradas em UTIs (LIVERMORE, 2012).

Uma troca massiva na distribuição das ESBLs ocorreu a partir do ano 2000, com a distribuição das enzimas CTX-M pertencentes ao tipo 1. Diferentemente das variantes TEM e SHV, essas ESBLs não são mutantes de antigas penicilinas codificadas por plasmídeos. Os genes que codificam as variantes CTX-M originaram-se de cromossomos de *Kluyvera spp.*, um gênero que não possui importância clínica direta e foi transmitido a plasmídeos por uma sequência de inserção. Plasmídeos que codificam as enzimas CTX-M foram posteriormente transmitidos a bactérias oportunistas de humanos e se proliferaram em *E. coli* comunitária e *Klebsiella spp.* hospitalar. Essa transmissão de genes ocorreu repetidamente, sendo encontradas diversas famílias circulantes de CTX-M (LIVERMORE, 2012). Estudos filogenéticos mostram cinco grandes grupos de enzimas CTX-M: 1, 2, 8, 9, e 25. A identidade entre membros do mesmo grupo é de mais de 94%, enquanto entre membros pertencentes a grupos distintos é igual ou menor a 90% (BONNET, ROBERT, 2004).

No Brasil, as cefalosporinas de terceira geração começaram a ser utilizadas para tratamento clínico no início dos anos de 1980 e desde 1985, observam-se enterobactérias resistentes a esses antimicrobianos (SAMPAIO; GALES, 2016). Entretanto, o primeiro relato de resistência só foi publicado em 1994 (JONES; MARSHALL, 1994). Somente em 1997 houve a confirmação de enterobactérias produtoras de ESBL em 72 isolados clínicos de *K. pneumoniae* em São Paulo e Rio de Janeiro (GALES, A. *et al.*, 1997). Os primeiros estudos moleculares para identificação de ESBL no Brasil são do ano 2000, evidenciando a predominância dos genes *bla*_{CTX-M}. Em 2016, Sampaio e Gales publicaram um estudo de revisão sobre a prevalência de ESBLs no Brasil, no qual verificou-se que a enzima CTX-M-2 foi a mais frequente e também a que foi detectada em um maior número de espécies de enterobactérias, incluindo *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*,

Salmonella typhimurium e *Serratia marcescens*. Outras enzimas ESBL detectadas foram: Grupo 1 - CTX-M-1, 3, 15, 28; Grupo 2 - CTX-M-2, 59, 74, 75, 131; Grupo 8 - CTX-M-8; Grupo 9 - CTX-M-9, 14, 16; BES-1, PER-2 e variantes das enzimas GES, SHV e TEM (SAMPAIO; GALES, 2016).

1.4.1.1.2 Carbapenemases

O aumento da prevalência de enterobactérias resistentes a cefalosporinas levou ao uso direto e empírico de carbapenêmicos como os únicos β -lactâmicos disponíveis no mercado que se apresentam estáveis às enzimas ESBLs e AmpC (LIVERMORE, 2012).

Os carbapenêmicos mantiveram sua atividade contra enterobactérias por cerca de 20 anos depois da introdução do Imipenem (em 1985), mas atualmente a resistência é crescente. Essa resistência pode envolver a perda de porinas, reduzindo a entrada de fármacos nas cepas que já contêm altos níveis de AmpC ou de alguma ESBL. Porém, o que é muito mais preocupante é a proliferação gradual de carbapenemases. Carbapenemases são β -lactamases capazes de hidrolisar antimicrobianos β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. Elas são bioquimicamente diversas e incluem membros de três das quatro classes de β -lactamases (A, B e D) (LIVERMORE, 2012; LUPO *et al.*, 2013).

As opções terapêuticas para micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos são bastante limitadas, geralmente incluem o uso de polimixinas, tigeciclina e em alguns casos, aminoglicosídeos (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

1.4.1.1.2.1 Carbapenemases de classe A

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases) são pertencentes à classe A e são codificadas pelo gene *bla*_{KPC}. Atualmente são as carbapenemases predominantes em enterobactérias. Elas foram identificadas primeiramente no estado da Carolina do Norte (EUA) em 1996, sendo descritas somente em 2001. Houve surtos em Nova York em 2005 e, desde 2006, bactérias portando o gene *bla*_{KPC} disseminaram-se pelos EUA, Israel, Grécia e mais tarde também pela Itália, com surtos crescentes na China, no Brasil e em diversos países Europeus. O gene *bla*_{KPC} tem se espalhado consideravelmente via plasmídeos entre diferentes cepas de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias, principalmente *E. coli* e *Enterobacter spp.* (LIVERMORE, 2012). No Brasil, a primeira descrição de KPC foi em 2009, em isolados de *K. pneumoniae* em Recife (MONTEIRO *et al.*, 2009). Entretanto, após esse

primeiro reporte, outros estudos verificaram que a disseminação de bactérias contendo KPC iniciou anteriormente, pelo menos desde 2005 (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). As cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC têm causado diversos surtos no Brasil, tornando-se uma das bactérias multirresistentes mais prevalentes no país (ANDRADE *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2013). Embora pelo menos 23 variantes de KPC estejam descritas atualmente, no Brasil só há relatos da variante KPC-2 (SAMPAIO; GALES, 2016).

Recentemente, uma nova carbapenemase de classe A foi descrita no Brasil, a BKC-1 (*Brazilian Klebsiella Carbapenemase*). Essa enzima foi identificada em três isolados clínicos de hospitais de São Paulo. Além de carbapenêmicos, essa enzima é capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (VASCONCELOS; OLIVEIRA; GALES, 2015).

1.4.1.1.2.2 *Carbapenemases de classe B*

As carbapenemases de classe B (metalo- β -lactamases, MBLs) são bioquimicamente muito diferentes da KPC. As principais enzimas incluídas nessa classe são: IMP (*Imipenemase Metallo- β -lactamase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) e NDM (*New Delhi Metallo- β -lactamase*).

IMP foi identificada primeiramente no Japão no final da década de 1980 e se espalhou gradualmente pelo mundo, embora não tenha atingido grande prevalência em lugar algum (LIVERMORE, 2012; WATANABE *et al.*, 1991). No Brasil, IMP-1 foi a primeira carbapenemase a ser identificada em enterobactérias. Essa enzima foi descrita em 2005, quase 20 anos após a introdução do uso clínico de carbapenêmicos no país, em um isolado de *K. pneumoniae* em São Paulo (LINCOPAN *et al.*, 2005; SAMPAIO; GALES, 2016). Desde então, casos esporádicos de *K. pneumoniae*, *P. rettgeri* e *Serratia marcescens* produtoras de IMP foram reportados no Brasil (LINCOPAN, 2006; PENTEADO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2015).

A enzima VIM foi primeiramente descrita em *P. aeruginosa* em Verona (Itália) no ano de 1997 (LAURETTI *et al.*, 1999), posteriormente ela se espalhou pelas enterobactérias, principalmente em *K. pneumoniae*. Grupos de *K. pneumoniae* com carbapenemases do tipo VIM têm sido descritas cada vez mais no mundo inteiro, embora elas sejam menos numerosas do que os isolados com KPC (LIVERMORE, 2012).

A metalo- β -lactamase NDM foi descrita primeiramente em 2009 em Nova Délhi, na Índia, em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Essa

enzima tornou-se uma das carbapenemases mais frequentes e tem se espalhado rapidamente entre as enterobactérias em todos os continentes (LIVERMORE, 2012; LUPO *et al.*, 2013). O primeiro relato de NDM no Brasil ocorreu em 2013 em uma cepa de *Providencia rettgeri* (enterobactéria) isolada na cidade de Porto Alegre, RS (CARVALHO-ASSEF *et al.* 2013). Ainda em 2013, essa enzima foi detectada nas enterobactérias *Enterobacter cloacae* e *Morganella morganii*, em hospitais da mesma cidade (ROZALES *et al.*, 2014). Comparada com a disseminação da KPC no Brasil, que ocorreu cerca de 10 anos após o primeiro relato nos EUA, a enzima NDM foi detectada em menos tempo (4 anos), o que indica seu grande potencial de disseminação no país (SAMPAIO; GALES, 2016). Atualmente, há relatos da coprodução de NDM-1 e KPC-2 em isolados de *Providencia rettgeri* e *E. cloacae* no Rio de Janeiro (PEREIRA; BORGHI; ASENSI, 2014; QUILES *et al.*, 2015). O gene *bla*_{NDM} também foi descrito em isolados de *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* e *P. rettgeri* em Brasília, provenientes de pacientes de seis hospitais (FARIA-JUNIOR *et al.*, 2016).

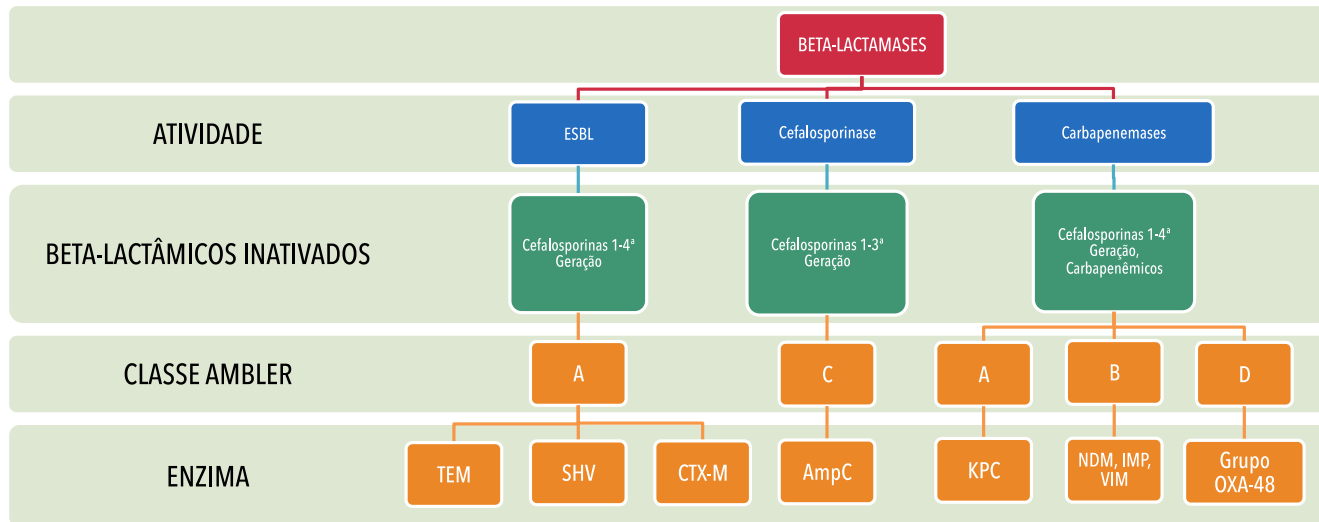
1.4.1.1.2.3 Carbapenemases de classe D

As carbapenemases de classe D são também denominadas oxacilinases (OXAs). As OXAs formam um grupo de 232 enzimas, algumas são classificadas como ESBLs e outras como carbapenemases. Inicialmente, as β -lactamases do tipo OXA foram descritas em *P. aeruginosa*, mas desde então essas enzimas têm sido descritas em diversas outras bactérias Gram-negativas, incluindo enterobactérias. A OXA-48 é a enzima mais identificada ao redor do mundo. Essa enzima hidrolisa penicilinas, tendo uma atividade fraca contra carbapenêmicos e cefalosporinas de espectro estendido. Entretanto, a sua frequente associação com ESBLs aumenta o nível de resistência aos carbapenêmicos (DJAHMI *et al.*, 2014). A enzima OXA-48 foi identificada pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2001, desde então, cepas produtoras de OXA-48 têm sido amplamente descritas em surtos de IRAS em várias partes do mundo, principalmente em países mediterrâneos (DJAHMI *et al.*, 2014; POIREL *et al.*, 2004). No Brasil há poucos relatos de OXA-48 em enterobactérias, sendo o primeiro no ano de 2013, em Porto Alegre, quando descreveu-se uma nova variante de OXA-48 (OXA-370) em *Enterobacter hormaechei* proveniente de *swab* retal de um paciente de UTI (SAMPAIO *et al.*, 2014).

1.5 MÉTODOS PARA ESTUDOS DE INFECÇÕES

As etapas fundamentais utilizadas nos estudos de infecções bacterianas são: isolar o patógeno, identificar a espécie, testar sua suscetibilidade antimicrobiana e virulência e, em determinados casos, realizar a tipagem intra-específica. As primeiras três etapas são cruciais para o ótimo gerenciamento dos pacientes infectados e a última etapa é mais aplicada para identificação de surtos e em estudos de vigilância epidemiológica (DIDELOT *et al.*, 2012).

Figura 1: Esquema de classificação das principais enzimas β -lactamases encontradas em *Enterobacteriaceae*.



Adaptado de VASOO et al., 2015.

1.5.1 Identificação Bacteriana

Atualmente, um dos maiores desafios na prática clínica e nos programas de vigilância de saúde é a identificação rápida e precisa dos agentes infecciosos. A identificação correta da espécie microbiana pode auxiliar no delineamento de melhores estratégias de controle de infecção e na escolha de tratamentos mais eficazes, melhorando o prognóstico dos pacientes (DIDELOT *et al.*, 2012; SRINIVASAN *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, a identificação bacteriana nos laboratórios de microbiologia clínica é realizada por testes fenotípicos, que analisam o perfil metabólico ou a composição química do organismo. Esses testes incluem coloração de Gram, análises de crescimento e morfologia das colônias, reações bioquímicas rápidas e testes auxiliares (DIDELOT *et al.*, 2012; WOO *et al.*, 2008). Embora esses métodos sejam relativamente mais baratos e sejam sensíveis para a identificação das bactérias mais comumente encontradas nas infecções, alguns grupos de bactérias são difíceis de serem identificados, principalmente bactérias mais raras ou que possuam perfis ambíguos (WOO *et al.*, 2008). Além disso, é um processo demorado, que pode requerer de 24 a 48h (SINGHAL *et al.*, 2015). Métodos fenotípicos automatizados para a identificação microbiana começaram a surgir na década de 1970 nos laboratórios de microbiologia clínica (STAGER; DAVIS, 1992). Com esses sistemas, as provas bioquímicas são feitas de maneira automatizada, incluindo a inoculação, incubação e a leitura, com os resultados sendo visualizados em computador (BOU *et al.*, 2011). Os sistemas automatizados mais difundidos comercialmente no Brasil são: Vitek2[®] (BioMérieux), MicroScan Walk-Away[®] (Dade International) e BD Phoenix[™] (BD Diagnostic Systems).

As técnicas fenotípicas possuem a vantagem de fornecer informações funcionais mais diretas, revelando as atividades metabólicas responsáveis pela sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do organismo. Além da identificação fenotípica convencional, os micro-organismos podem ser identificados com base na sua informação genética (SINGHAL *et al.*, 2015). As técnicas genotípicas possuem algumas vantagens em relação às fenotípicas, já que independem do estado fisiológico do organismo, não são influenciadas pela composição do meio de cultura, pela fase de crescimento do organismo ou por condições ambientais, como temperatura e níveis de pH, sendo consideradas menos subjetivas (EMERSON *et al.*, 2008; JANDA; ABBOTT, 2002).

Dentre os métodos de identificação genotípica estão as técnicas de sequenciamento de DNA, seja pelo sequenciamento completo do

genoma bacteriano ou pelo sequenciamento de genes específicos ou altamente conservados. Woese e Fox foram os pioneiros na utilização do 16S rRNA nos estudos de relação filogenética entre os organismos (WOESE; FOX, 1977). Desde então, o sequenciamento desse marcador se tornou o padrão ouro nos estudos de taxonomia bacteriana (EMERSON *et al.*, 2008; SINGHAL *et al.*, 2015).

O gene 16S rDNA codifica um RNA catalítico que é parte da subunidade 30S ribossomal, por diversos motivos ele tem sido o marcador genético mais utilizado nos estudos de filogenia e taxonomia bacteriana: (1) por estar presente em todos os procariotos; (2) por ter regiões conservadas e variáveis, evoluindo em taxas diferentes; (3) por sua função não ter sido alterada ao longo do tempo; e (4) por ser um gene grande o suficiente para análises de bioinformática (~1.500 pb) (JANDA; ABBOTT, 2007; SRINIVASAN *et al.*, 2015). Uma vantagem de se ter regiões conservadas é facilitar o desenho de iniciadores de PCR que tenham como alvo uma ampla gama de micro-organismos, enquanto as regiões altamente variáveis são importantes por permitirem a discriminação de diferentes *taxa* (VOS *et al.*, 2012). Com o estudo do 16S rRNA, diversos gêneros e espécies de bactérias foram reclassificados e renomeados, a classificação de bactérias não cultiváveis se tornou possível, relações filogenéticas foram determinadas e a descoberta de novas espécies bacterianas foi facilitada (WOO *et al.*, 2008).

As dificuldades ainda encontradas pelo sequenciamento do 16S rRNA para identificação microbiológica incluem: a necessidade de geração de seqüências de alta qualidade; erros de anotação nos bancos de dados; espécies que compartilham seqüências muito similares ou idênticas; bancos de dados incompletos para determinados organismos; etc. (JANDA; ABBOTT, 2007; SRINIVASAN *et al.*, 2015). Outro fator importante a ser considerado é que o gene 16S rRNA é encontrado em múltiplas cópias no genoma bacteriano, podendo apresentar certa variação intragenômica entre essas cópias (CASE *et al.*, 2007; COENYE; VANDAMME, 2003; PEI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2013). Em *Enterobacteriaceae* observa-se uma média de sete cópias por genoma (STODDARD *et al.*, 2015).

Após alguns estudos terem questionado a sensibilidade do 16S rRNA, principalmente para a identificação de enterobactérias, Mollet e colaboradores, em 1997, sugeriram a utilização do gene *rpoB* como outro marcador para identificação bacteriana. Assim como o 16S rRNA, o *rpoB* é universal e já havia sido utilizado anteriormente como base para análises filogenéticas de arqueia e bactéria (MOLLET;

DRANCOURT; RAOULT, 1997). O gene *rpoB* codifica a subunidade β da RNA polimerase e também possui regiões conservadas e variáveis. Ao contrário do 16S rRNA, ele está presente em uma única cópia no genoma bacteriano, o que fez com que ele fosse estudado como uma alternativa para a determinação mais precisa da diversidade e abundância nos estudos de ecologia microbiana (CASE *et al.*, 2007; DAHLLOF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000). Apesar do *rpoB* apresentar um bom poder discriminatório para determinação de cepas e espécies, ele apresenta algumas limitações: não é um gene conservado o suficiente para ser utilizado como um marcador universal, sendo que os iniciadores de PCR precisam ser desenhados para grupos menores de micro-organismos. Outro fator importante são os problemas para classificação das sequências, devido à ausência de bancos de dados e softwares de classificação apropriados (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2008; VOS *et al.*, 2012).

Outro método de identificação microbiana que vem sendo utilizado nos laboratórios de microbiologia clínica é o MALDI-TOF (dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz – analisador de massas por tempo de voo, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*). Este método é baseado na tecnologia de espectrometria de massas, no qual as moléculas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico e separadas de acordo com a razão entre a sua massa e carga elétrica. As moléculas que são utilizadas para essa identificação são proteínas altamente conservadas, como proteínas ribossomais e mitocondriais. Essa análise gera padrões únicos para cada espécie, possibilitando uma identificação rápida e barata. Os dois equipamentos disponíveis no mercado que possuem aprovação pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) são: MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics Inc.) e VITEK[®] MS (bioMérieux) (SINGHAL *et al.*, 2015).

1.5.2 Caracterização do Perfil de Resistência a Antimicrobianos

Principalmente nas IRAS, é essencial que haja uma caracterização rápida e precisa dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, isso ajuda a determinar terapias mais adequadas e a implementar medidas efetivas que contenham a disseminação desses micro-organismos (LUPO *et al.*, 2013). Essa caracterização é tão importante quanto a determinação do agente etiológico, principalmente no cenário atual, onde se observa um aumento crescente na resistência microbiana (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

Diversos testes estão disponíveis nos laboratórios de microbiologia clínica para caracterizar a suscetibilidade aos

antimicrobianos, seja pela pesquisa de mecanismos específicos de resistência ou pela análise do fenótipo (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

A análise do fenótipo de resistência é realizada pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA). Este teste é indicado para patógenos com resistência não predizível aos antimicrobianos comumente prescritos, sendo também importante para avaliar a atividade de novos compostos e para estudos epidemiológicos de bactérias resistentes. Os métodos mais comuns para fazer o TSA são: diluição (em ágar ou caldo); disco-difusão em ágar; e difusão de gradiente (Etest[®]) (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

Métodos automatizados, além de fazerem a identificação do micro-organismo, também podem fazer o TSA. O uso desses instrumentos permite a execução dos testes de suscetibilidade com mais rapidez, pois estes aparelhos possuem recursos capazes de detectar alterações discretas do crescimento bacteriano. Os métodos automatizados avaliam duas a quatro diluições em geral, que representam as concentrações referentes aos limites de sensibilidade ou resistência de cada antimicrobiano. Dessa maneira, o sistema relata se a bactéria apresentou MIC (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration* – Concentração Inibitória Mínima) superior ou inferior aos limites de resistência. O sistema também pode reportar se o valor de MIC encontra-se na categoria intermediária. Por isso, é possível afirmar que os resultados fornecidos por estes sistemas são semi-quantitativos. As vantagens de se usar um sistema automatizado são: (1) maior rapidez na emissão dos resultados; (2) padronização intra e interlaboratorial; (3) disponibilidade de programas de computação adicionais que permitem a redução do trabalho manual e a emissão simultânea de relatórios para a farmácia hospitalar; (4) alguns sistemas ainda possuem um programa de computação que auxilia na interpretação dos resultados. Algumas desvantagens são: (1) estes sistemas são onerosos; (2) não fornecem o resultado exato de MIC (com exceção do BD Phoenix[™], que apresenta diluições seriadas); (3) alguns equipamentos não apresentam uma boa acurácia na detecção da expressão de alguns mecanismos de resistência, principalmente, os mecanismos de resistência induzíveis, que demandam maior tempo para sua expressão (ANVISA, 2008).

Outra forma de determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos é pela pesquisa de mecanismos específicos de resistência. Embora estes testes não resultem na determinação de uma MIC, alguns deles possuem especificidade e sensibilidade suficientes, dispensando testes confirmatórios. Para enterobactérias, o mecanismo mais pesquisado é a presença de β -lactamases (como as ESBLs e

carbapenemases). Um resultado positivo é indicativo de que o organismo é resistente a determinados agentes β -lactâmicos, entretanto, um resultado negativo é inconclusivo, já que outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem existir (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

A detecção dessas β -lactamases pode ser realizada por testes fenotípicos que se baseiam na inibição da atividade da enzima pelos inibidores de β -lactamases (IBL). Há 3 tipos de testes mais amplamente usados: testes acidimétricos, iodométricos e cromogênicos. Todos envolvendo crescimento dos isolados em meio de cultura não seletivo (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

A produção de β -lactamases também pode ser pesquisada por método genotípico, no qual o gene codificador de tais enzimas é detectado, geralmente por PCR. Estes testes apresentam o potencial de melhorar as decisões terapêuticas para os pacientes e auxiliar em investigações epidemiológicas sobre a disseminação de genes de resistência no ambiente hospitalar e na comunidade (JENKINS; SCHUETZ, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

As enterobactérias são um dos micro-organismos mais frequentemente encontrados nas IRAS, tanto no cenário brasileiro como mundial. Um fator que as torna ainda mais preocupantes são os seus altos níveis de resistência antimicrobiana. Em 2013, o Centro de Controle de Prevenção de Doenças americano (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC, EUA) classificou as enterobactérias produtoras de ESBL como uma ameaça grave à saúde, enquanto que as resistentes aos carbapenêmicos (CRE, *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) foram classificadas como uma ameaça urgente (CDC, 2013). Devido a sua grande relevância, é importante que esses patógenos sejam identificados corretamente e que seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos sejam bem caracterizados, isso permite que se entenda melhor a epidemiologia dessas infecções e que se desenvolvam programas efetivos de prevenção, controle e tratamento a nível regional e nacional.

De acordo com o CDC, há quatro ações a serem tomadas para ajudar na luta contra as infecções causadas por bactérias resistentes:

- 1 – Prevenir as infecções e a disseminação dos mecanismos de resistência;
- 2 – Rastrear as bactérias resistentes;
- 3 – Melhorar o uso dos antimicrobianos atuais;
- 4 – Promover o desenvolvimento de novos antimicrobianos e novos testes diagnósticos para as bactérias resistentes (CDC, 2013).

Nesse sentido, este trabalho procura contribuir com o rastreamento de enterobactérias resistentes em ambiente hospitalar, bem como com a caracterização dos seus mecanismos de resistência, fornecendo dados epidemiológicos mais precisos para implantação de medidas de controle de IRAS e da disseminação da resistência bacteriana.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar, por meio de técnicas fenotípicas e genotípicas, bactérias da família *Enterobacteriaceae* provenientes de amostras de pacientes, profissionais da área da saúde e ambiente hospitalar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a proporção de amostras positivas para enterobactérias nas diferentes sítios de coleta (em pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar) e unidades hospitalares;
- Identificar os isolados de enterobactérias por método fenotípico e genotípico, comparando os resultados obtidos por ambos os métodos;
- Determinar a abundância das espécies de enterobactérias nos diferentes sítios de coleta e unidades hospitalares;
- Realizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) nas enterobactérias analisadas e classificá-las de acordo com o seu perfil fenotípico de resistência;
- Caracterizar as enterobactérias quanto ao perfil genotípico de resistência aos β -lactâmicos, pela pesquisa de genes codificadores de β -lactamases;
- Correlacionar os resultados obtidos por meio das análises de fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana;
- Verificar a distribuição das enterobactérias resistentes aos antimicrobianos nos diferentes sítios de coleta e unidades hospitalares;
- Correlacionar os resultados obtidos com dados clínicos-epidemiológicos.

4. METODOLOGIA

4.1 PROJETO HAIMP

Este trabalho faz parte de um projeto de microbioma hospitalar denominado “*Healthcare Associated Infections Microbiome Project*” (HAIMP), que visa o rastreamento, a identificação e a caracterização de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar.

As coletas de amostras foram realizadas mensalmente, entre abril e setembro de 2015, no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

O projeto possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC) sob o número 32930514.0.0000.0121. Além das amostras de ambiente hospitalar, foram coletadas amostras de pacientes e profissionais da área de saúde, que participaram do estudo de forma voluntária, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam um questionário com seus dados pessoais e informações sobre seu histórico médico e rotina de trabalho (no caso dos profissionais) (Apêndices A, B e C).

4.2 COLETAS DAS AMOSTRAS

Os isolados de enterobactérias utilizados nesse estudo são provenientes de amostras coletadas de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar. É importante destacar que nem todos os pacientes que participaram do estudo estavam sabidamente infectados ou colonizados por bactérias, uma vez que o critério de inclusão foi o de maior tempo de internação.

O estudo foi realizado em cinco unidades do hospital: unidade de atendimento de emergência (EMG), unidade de terapia intensiva (UTI), centro cirúrgico (CC) e duas unidades de internação - Clínica Médica 1 (CM1) e Clínica Cirúrgica 1 (CR1). A CM1 é uma unidade utilizada principalmente para a internação de pacientes infectados ou colonizados por bactérias resistentes.

Todas as amostras foram coletadas utilizando um *swab* de *rayon* (Copan Diagnostics, Inc.), umedecido com soro fisiológico estéril e transportado em meio Amies. Cento e oitenta pontos de coleta foram monitorados mensalmente ao longo dos seis meses de estudo, totalizando 1.080 amostras coletadas (Tabela 1). No Apêndice D estão descritos detalhadamente os 180 pontos de coleta.

Tabela 1: Descrição e distribuição dos pontos de coleta por unidade hospitalar e por fonte de coleta das amostras coletadas pelo projeto HAIMP entre abril-setembro/2015.

| FONTE | PONTOS DE COLETA | UNIDADES HOSPITALARES | | | | | TOTAL N (%) |
|--------------------------|---|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | CC | CRI | CMI | EMG | UTI | |
| PACIENTE | Mãos | | | | | | |
| | Nariz | 0 | 36 | 36 | 54 | 72 | 198 (18,3%) |
| | Reto | | | | | | |
| PROFISSIONAL DE SAÚDE | Mãos | | | | | | |
| | Vestimenta/jaleco | 36 | 36 | 36 | 36 | 72 | 216 (20%) |
| | Telefone celular | | | | | | |
| AMBIENTE HOSPITALAR | Quartos dos respectivos pacientes (grades de leito, equipamentos, banheiro, etc.); equipamentos de uso comum (raio X, ultrassom, carrinho de banho, poltrona de fisioterapia, glicosímetro, etc.); áreas de trabalho dos profissionais (postos de enfermagem, salas de medicamentos, expurgo, etc.); áreas de descanso dos profissionais (copa, vestiários e salas de repouso). | 108 | 84 | 90 | 144 | 240 | 666 (61,7%) |
| TOTAL N (%) | | 144 (13,3%) | 156 (14,4%) | 162 (15%) | 234 (21,7%) | 384 (35,6%) | 1.080 (100%) |

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O processamento inicial das amostras foi realizado no laboratório de microbiologia molecular da empresa Neopropecta, uma *startup* de biotecnologia localizada no parque tecnológico Sapiens Parque, em Florianópolis, Santa Catarina.

Como as coletas mensais foram sempre realizadas em dois dias, todos os demais processamentos também foram feitos em dois dias para obedecer os mesmos tempos de processamento. Os *swabs* foram mantidos refrigerados em meio de transporte Amies por 48 horas e depois desse período as amostras foram inoculadas em caldo BHI (do inglês, *Brain-heart infusion*), um meio de enriquecimento microbiano não seletivo, e foram incubadas por 12 a 18 horas a 36 ± 1 °C. As amostras foram então semeadas em ágar MacConkey, um meio de cultura seletivo para bacilos Gram-negativos, sendo incubadas por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C. As colônias de bactérias Gram-negativas identificadas foram isoladas por esgotamento também em ágar MacConkey.

Os isolados obtidos seguiram para a identificação microbiológica e caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos. Tanto para as análises fenotípicas como genotípicas, foram utilizados os isolados de uma única placa de ágar MacConkey. Posteriormente, os isolados foram armazenados em nitrogênio líquido em BHI com 15% de glicerol.

O DNA dos isolados bacterianos foi utilizado para todas as análises de biologia molecular. A extração do DNA foi realizada pela técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil). O DNA foi quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit[®] 2.0, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Após quantificação o DNA foi diluído a 0,5 ng/μL e armazenado a -20 °C para as análises moleculares futuras.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

4.4.1 Identificação Fenotípica

4.4.1.1 Sistema Vitek2[®]

O método fenotípico que foi utilizado como referência para a identificação de todos os isolados bacterianos foi o sistema automatizado Vitek2[®] (bioMérieux), método usado na rotina pelo próprio hospital. Esta etapa foi realizada no equipamento do Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HU/UFSC. O

procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o cartão GN Test Kit. Este cartão possui 64 poços, cada um contendo antimicrobianos ou substratos para identificação bacteriana de micro-organismos Gram-negativos. O cartão inclui 41 testes bioquímicos fluorescentes, contendo 18 testes enzimáticos para aminopeptidases e oxidases.

Uma colônia do isolado a ser identificado é suspensa em solução salina 0,45% e medida em turbidímetro até que se obtenha uma suspensão com turbidez entre 0,50 e 0,63 de acordo com a escala de McFarland. Os cartões e as suspensões são colocados manualmente no módulo “*reader-incubator*” do equipamento, onde são incubados a 35,5 °C. O cartão é automaticamente preenchido por um dispositivo de vácuo e selado. Cada cartão é sujeito a medidas cinéticas de fluorescência a cada 15 minutos, durante um período de incubação de aproximadamente quatro horas. Os resultados são interpretados por comparação com um banco de dados e são visualizados no software do próprio equipamento (FUNKE *et al.*, 1998).

4.4.1.2 MALDI-TOF

Outro método utilizado para a identificação de alguns isolados foi o MALDI-TOF, utilizando o equipamento Vitek[®] MS, um sistema automatizado de identificação microbiana baseado em espectrometria de massas. Essa etapa foi realizada no Laboratório Médico Santa Luzia, em Florianópolis.

Para essa análise, os isolados, que estavam estocados em nitrogênio líquido, foram semeados em um meio de cultura não seletivo (LB – Luria Bertani). A técnica consiste em utilizar uma colônia do isolado bacteriano a ser identificado, misturá-lo a uma matriz e adicioná-lo a um *slide*. Esse *slide* é submetido a um forte ambiente de vácuo e a amostra é ionizada por uma explosão de laser, que libera uma “nuvem” de proteínas. Essas proteínas são aceleradas usando uma carga elétrica e o tempo de voo é registrado. Proteínas mais leves viajam de forma mais rápida que as proteínas mais pesadas. No final, as proteínas são detectadas por um sensor, que cria um espectro representando a composição de proteínas de cada amostra. Comparando-se o espectro de uma amostra específica contra um amplo banco de dados de espectros de micro-organismos bem caracterizados, consegue-se fazer a identificação microbiológica a nível de espécie, gênero e família (BIOMERIEUX, 2017).

4.4.2 Identificação Genotípica

4.4.2.1 Sequenciamento de Marcadores Moleculares

Todos os isolados bacterianos foram submetidos ao sequenciamento do marcador molecular 16S rRNA. Adicionalmente, alguns isolados que apresentaram resultados ambíguos e discordantes também tiveram o marcador *rpoB* analisado.

A análise desses marcadores foi realizada por sequenciamento de larga escala (*high-throughput*) utilizando a plataforma MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA). Essa etapa foi realizada no laboratório de biologia molecular da Neopropecta, seguindo protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil). Os iniciadores utilizados para a amplificação do fragmento 16S rRNA são específicos para a região V3-V4: 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO *et al.*, 2012). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o kit de sequenciamento MiSeq Reagent Kit V2, com 300 ciclos, cobertura de 60.000 *reads* por amostra e abordagem de *single-end reads*.

As seqüências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário, intitulado Sentinel (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil). Resumidamente, todas as seqüências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as seqüências de DNA que correspondem aos adaptadores da tecnologia Illumina por meio de métodos biocomputacionais. As seqüências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação com banco de dados de seqüências acuradas (NeoRef, Neopropecta). Essa comparação é feita pelo software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI - National Center for Biotechnology Information) e faz a classificação com base na frequência de cada táxon que apresentou no mínimo 99% de identidade. Após essa análise, adotou-se o critério de só considerar clusters que juntos, somavam pelo menos 95% do total de seqüências, a fim de não considerar pequenas contaminações.

O software MEGA (versão 7.0.16) foi utilizado para alinhar as seqüências (usando ClustalW) e calcular as distâncias entre elas (*pairwise distance*), com *bootstrap* de 1.000.

4.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

4.5.1 Análise do Fenótipo de Resistência aos Antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos isolados obtidos foi feito pelo sistema automatizado Vitek2[®] (bioMérieux), juntamente com a identificação microbiológica no serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC. Utilizou-se o cartão AST N239, que testa a sensibilidade às seguintes classes de antimicrobianos: aminoglicosídeos, penicilinas, penicilinas com inibidores de β -lactamase, cefamicinas, cefalosporinas de 1^a-4^a geração, fluoroquinolonas, polimixinas, carbapenêmicos, penicilinas anti-pseudomonas com inibidores de β -lactamase e gliciliclinas.

A mesma colônia de cada isolado, que foi suspensa em solução salina 0,45% para identificação microbiológica, foi diluída de acordo com instruções do fabricante para realização do TSA. Para esses cartões o equipamento avalia cada poço contendo antimicrobiano a cada 15 minutos. Os resultados são usados para gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, o equipamento fornece uma estimativa da concentração inibitória mínima (MIC), liberando um antibiograma com um resultado de sensibilidade, resistência ou resistência intermediária para cada antimicrobiano testado.

A classificação dos isolados bacterianos baseada nos resultados de TSA seguiu os critérios sugeridos em 2011 por uma iniciativa entre os centros de controle e prevenção de doenças americano e europeu (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* e ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*):

- MDR (*Multidrug resistant*): isolado não suscetível a 1 ou mais agentes pertencentes a ≥ 3 classes de antimicrobianos;
- XDR (*Extensive Drug Resistance*): isolado resistente a 1 ou mais agentes pertencentes a todas as classes de antimicrobianos, com exceção de uma ou duas classes.
- PDR (*Pandrug resistant*): isolado resistente a um ou mais agentes pertencentes a todas as classes de antimicrobianos.

Entretanto, o cartão AST N239 não testa resistência a todos os antimicrobianos preconizados, como: cefalosporinas anti-MRSA (ceftarolina), inibidores da síntese do folato (trimetoprima-sulfametoxazol), monobactâmicos (aztreonam), fenicóis (cloranfenicol), ácidos fosfônicos (fosfomicina) e tetraciclina (tetraciclina, doxiciclina e minociclina). Portanto, não foi possível classificar os isolados como XDR ou PDR, já que para atribuir essas classificações era preciso testar

todas as classes. Quando um isolado apresenta resistência a todas as classes testadas de antimicrobianos, pode-se classificá-los como “possível XDR” ou “possível PDR”. Nessa classificação, quando uma espécie apresenta resistência intrínseca a uma classe ou a um antimicrobiano específico, ele deve ser desconsiderado no momento de aplicar os critérios de classificação (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

Além dessa classificação, os isolados também foram analisados especificamente em relação à resistência às cefalosporinas de espectro estendido (ESC) e aos carbapenêmicos (CARB).

4.5.2 Análise do Perfil Genotípico de Resistência aos Antimicrobianos (Genes de β -lactamases)

O genótipo de resistência aos antimicrobianos foi determinado pela presença de diferentes genes de resistência aos beta-lactâmicos, todos codificadores de enzimas β -lactamases, incluindo ESBLs e carbapenemases.

A detecção foi feita por PCR em tempo real (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* - qPCR), por meio de ensaios *multiplex*, utilizando-se sondas de hidrólise e iniciadores específicos desenvolvidos pela empresa Neopropecta. As reações foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo 1 μ L (0,5 ng) de DNA e 9 μ L de Master Mix 1X (sondas marcadas: HEXTM, FAMTM e VICTM; referência passiva: ROXTM; iniciadores *forward* e *reverse*). Um controle negativo e um controle positivo para cada gene de resistência foi incluído em cada ensaio de qPCR. As amostras e controles foram analisados em triplicata técnica. O equipamento utilizado foi o ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação: 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. De acordo com o *threshold* pré-estabelecido, foram consideradas positivas as amostras com Cq \leq 33. O protocolo citado é proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

Foram pesquisados 11 grupos de genes de resistência:

- *bla*_{SHV}, que inclui enzimas ESBLs e NSBL (SHV-1);
- *bla*_{CTX-M}, dos grupos 1, 2, 8, 9 e 25 (ESBLs)
- *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} (carbapenemases)

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o software MedCalc[®], versão 17.1. Foram calculadas as frequências absolutas e

relativas das variáveis categóricas e realizou-se teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para comparação de proporções entre os diferentes grupos, sendo $p \leq 0,05$ considerado significativo.

A análise de concordância entre os diferentes métodos foi realizada pelo coeficiente Kappa, no qual: $K = 1$ significa perfeita concordância entre os métodos; $K = 0$ indica concordância nula (a mesma esperada pelo acaso); e $K < 0$ indica que a concordância é mais fraca que o esperado pelo acaso, porém, isso ocorre raramente (COHEN, 1960). A interpretação dos valores de Kappa seguiu os seguintes critérios (ALTMAN, 1991):

- $< 0,20$: concordância muito fraca
- $0,21 - 0,40$: concordância fraca
- $0,41 - 0,60$: concordância moderada;
- $0,61 - 0,80$: concordância boa;
- $0,81 - 1,00$: concordância excelente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grande problema de saúde pública no mundo inteiro, porém, apresentam maior prevalência em países em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2005). O *Health-care Associated Infections Microbiome Project* (HAIMP) é um projeto de microbioma hospitalar que tem o intuito de entender a diversidade e a distribuição de bactérias resistentes no contexto hospitalar. Alguns dos micro-organismos de maior relevância nas IRAS são as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, devido a sua alta frequência e a sua facilidade de adquirir e transmitir genes de resistência aos antimicrobianos (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar as enterobactérias provenientes do projeto HAIMP, que foram coletadas entre os meses de abril e setembro de 2015 no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC), um hospital público que apresentou uma taxa de IRAS de 6,14% em 2015.

Um total de 180 pontos de coleta foram monitorados mensalmente em cinco unidades hospitalares, incluindo amostras de pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar, o que totalizou 1.080 amostras coletadas. Essas amostras foram semeadas em meio seletivo para bacilos Gram-negativos, obtendo-se um total de 273 amostras com culturas positivas (25,3%). Destas, 176 (64,45%) apresentaram somente isolados de enterobactérias, 63 (23,10%) foram positivas para outras espécies Gram-negativas (como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*) e 34 (12,45%) apresentaram tanto isolados de enterobactérias como de outras Gram-negativas. Ao total, as enterobactérias estavam presentes em 76,9% das amostras positivas (210/273).

A quantidade de isolados bacterianos para cada amostra positiva variou de um a quatro, sendo que a maioria (69%) das amostras positivas apresentaram somente um isolado. O projeto HAIMP obteve 390 isolados de bacilos Gram-negativos, destes, 56 (14,3%) são de *Acinetobacter spp.*, 41 (10,5%) de *Pseudomonas spp.*, 10 (2,3%) de outros Gram-negativos e a maioria (72,8%) são de isolados de enterobactérias (284 - $p < 0,0001$).

Esses resultados demonstram que as enterobactérias são os bacilos Gram-negativos mais distribuídos e mais abundantes entre pacientes, profissionais e ambiente do HU-UFSC.

5.1 DISTRIBUIÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

Além de serem encontradas colonizando diferentes sítios do corpo humano, as bactérias patogênicas relacionadas às IRAS podem sobreviver ou persistir por um longo tempo em superfícies. Muitas espécies Gram-negativas, como *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Shigella spp.* podem sobreviver por meses em superfícies inanimadas (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006). Por isso, o ambiente hospitalar apresenta grande importância na disseminação de bactérias patogênicas, estudos relatam, inclusive, que a desinfecção de superfícies próximas aos pacientes podem reduzir a aquisição desses patógenos (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

Nesse estudo de rastreamento, coletou-se amostras de diferentes sítios de pacientes (*swab* retal, nasal e das mãos), de profissionais da saúde (*swab* das mãos, da vestimenta e do telefone celular) e de ambiente hospitalar, incluindo, principalmente, superfícies de alto contato.

Das 1.080 amostras coletadas pelo projeto HAIMP, 210 (19,4%) apresentaram culturas positivas para alguma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, resultando em 284 isolados. Abaixo segue a distribuição dessas enterobactérias por fonte de coleta e por unidade hospitalar.

5.1.1 Distribuição de Enterobactérias por Fonte de Coleta

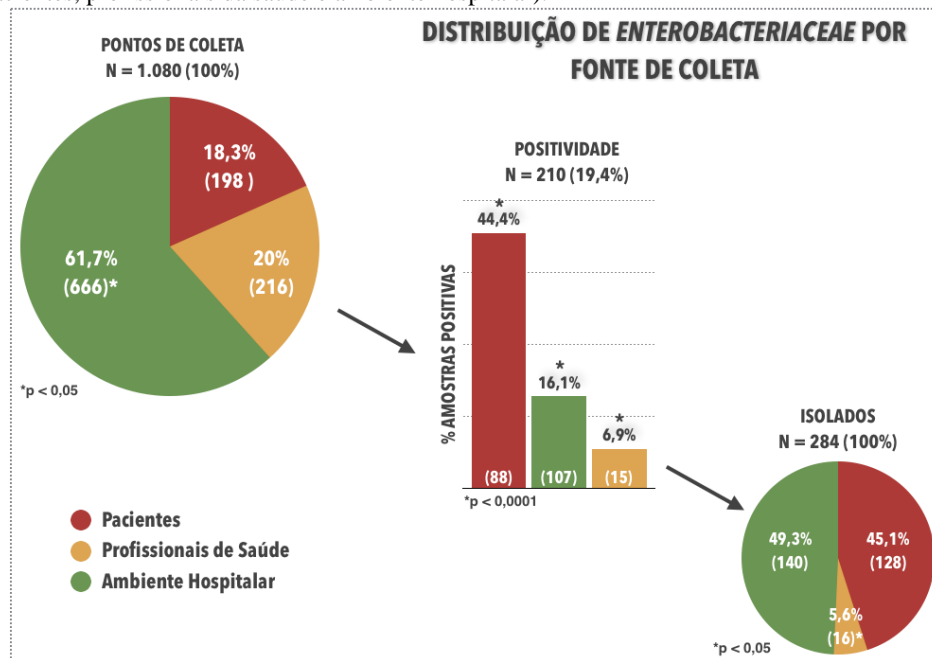
Na figura 2 está representada a distribuição das amostras coletadas por fonte de coleta (pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar), assim como a proporção de amostras positivas e o número de isolados obtidos.

A maioria das amostras (61,7%) foi coletada de ambiente hospitalar (666/1.080 - $p < 0,05$). De profissionais da saúde foram coletadas 216 amostras (20% - 216/1.080) e de pacientes foram coletadas 198 (18,3% - 198/1.080).

A maior proporção de amostras positivas foi encontrada em pacientes (44,4% - 88/198), seguida de ambiente (16,1% - 107/666) e de profissionais (6,9% - 15/216) ($p < 0,0001$).

Dos 284 isolados obtidos, 49,3% (140) são provenientes de ambiente hospitalar, 45,1% (128) de pacientes e 5,6% (16) de profissionais de saúde. A distribuição no número de isolados de ambiente e pacientes foi homogênea, porém, obteve-se uma quantidade significativamente menor de isolados de profissionais ($p < 0,05$).

Figura 2: Enterobactérias obtidas de amostras coletadas entre abril-setembro/2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC. Quantidade de pontos de coleta, proporção de amostras positivas (positividade) e quantidade de isolados obtidos. Distribuição por fonte de coleta (pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar).



As porcentagens representam as proporções em relação ao número total (N) de amostras analisadas. Entre parênteses estão as quantidades absolutas.

Na figura 3 pode-se observar, em ordem decrescente, as proporções de amostras positivas para enterobactérias encontradas nos diferentes sítios de coleta e a quantidade respectiva de isolados obtidos.

Nas amostras de pacientes, o sítio que apresentou maior proporção de amostras positivas e número de isolados foi o *swab* retal (89,4%, $p < 0,05$), um resultado esperado pelo fato das enterobactérias serem colonizadoras naturais do trato gastrointestinal humano. O *swab* nasal apresentou proporção de 28,8%, um resultado próximo à prevalência de enterobactérias encontradas em *swabs* nasais da população alemã (33%) (KOCK *et al.*, 2016). A proporção encontrada nas mãos foi de 15,2%, um sítio que é mais comumente colonizado por micro-organismos Gram-positivos.

As menores proporções de amostras positivas para enterobactérias foi encontrada naquelas provenientes dos profissionais de saúde, sendo 11,1% das vestimentas, 8,3% das mãos e somente 1,4% dos celulares. Os profissionais de saúde apresentam uma grande importância nos estudos de IRAS, pois podem servir como vetores na disseminação de microorganismos patogênicos. Muita importância é dada para a lavagem de mãos, que de fato, é uma medida primária na redução de IRAS e disseminação de micro-organismos resistentes (WHO, 2005). Porém, há poucos estudos sobre o papel da vestimenta dos profissionais de saúde (CALLAGHAN, 1998; PERRY; MARSHALL; JONES, 2001; SANON; WATKINS, 2012; WIENER-WELL *et al.*, 2011). Nesse trabalho, pode-se perceber que as vestimentas tiveram uma maior proporção de enterobactérias em relação às mãos, reforçando sua importância.

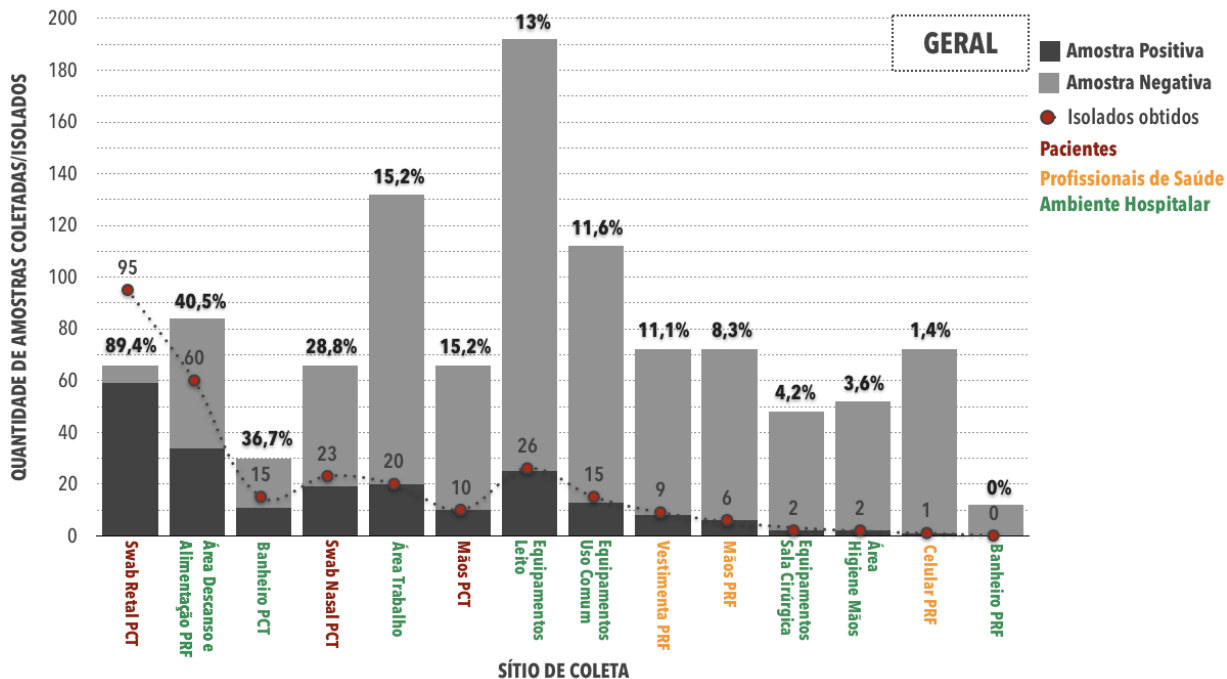
No ambiente hospitalar, as maiores proporções de amostras positivas foram encontradas nas áreas de descanso e alimentação dos profissionais (40,5%) e nos banheiros dos pacientes (36,7%) ($p < 0,05$). Em seguida estão as áreas de trabalho dos profissionais, como postos de enfermagem, salas de medicamentos, etc. (15,2%), os equipamentos de leito (13%) e os equipamentos de uso comum (11,6%). As menores proporções nas amostras de ambiente foram encontradas nos equipamentos da sala cirúrgica (4,2%), área de higiene de mãos (3,6%) e banheiro dos profissionais (0%).

Um resultado surpreendente foi que as amostras de ambiente hospitalar correspondentes às áreas de descanso e alimentação dos profissionais tiveram a segunda maior proporção de amostras positivas e número de isolados. Essas áreas incluem as copas, os vestiários e as salas de repouso. É importante destacar que os pontos de coleta em todas essas áreas foram superfícies de alto contato, como: puxadores,

botões, torneiras, etc. Um fator que poderia explicar esse resultado é que os procedimentos de higienização adotados nessas áreas não são tão rigorosos como nas demais áreas dos hospital. Além disso, talvez os profissionais não tenham os mesmos cuidados nessas áreas como os que têm quando estão nas áreas de trabalho ou lidando com pacientes. Uma medida que se sugere, além da conscientização dos profissionais, é a adoção de limpezas terminais periódicas nessas áreas, assim como limpezas mais detalhadas, que englobem a higienização das superfícies de alto contato.

A maioria dos isolados (54,6%) é proveniente de dois sítios de coleta: *swabs* retais dos pacientes (33,45% - 95/284) e áreas de descanso e alimentação dos profissionais (21,12% - 60/284). Além desses sítios de coleta terem apresentado uma maior proporção de amostras positivas, também foi observada uma maior quantidade de isolados por amostra positiva: 1,61 para *swabs* retais e 1,76 para as áreas de descanso e alimentação dos profissionais.

Figura 3: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

5.1.2 Distribuição de Enterobactérias por Unidade Hospitalar

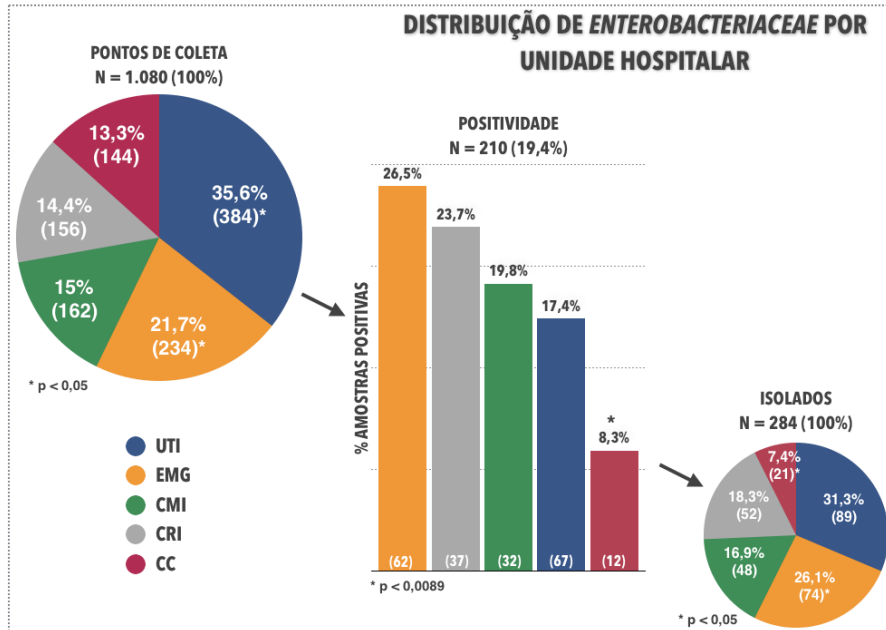
Na figura 4 está representada a distribuição das amostras por unidade hospitalar. Coletou-se mais amostras na UTI (35,6% - 384/1.080, $p < 0,05$) e na EMG (21,7% - 234/1.080, $p < 0,05$), uma vez que a EMG é uma unidade com maior número de leitos e diversidade de pontos de atendimento ao paciente e a UTI se dividia em duas áreas, UTI A e B, ou seja, também com maior número de leitos.

As proporções de amostras positivas para enterobactérias foi similar entre as unidades hospitalares, com exceção do CC, que apresentou uma proporção estatisticamente menor em relação a cada uma das demais unidades ($p < 0,0089$): EMG - 26,5%; CRI - 23,7%; CMI - 19,8%; UTI - 17,4% e CC - 8,3%.

Dos 284 isolados obtidos, a maioria (57,4%) é proveniente das duas unidades que tiveram maior quantidade de amostras coletadas: UTI (31,3% - 89/284) e EMG (26,1% - 74/284). Obteve-se uma quantidade estatisticamente menor de isolados do CC (7,4% - 21/284, $p < 0,05$).

Um dos fatores que pode justificar o baixo número de isolados obtidos do CC é que essa foi a única unidade de onde não foram coletadas amostras de pacientes, que geralmente apresentam grande quantidade de enterobactérias. Além disso, as salas cirúrgicas são higienizadas com uma alta frequência, sempre depois que algum procedimento é realizado, e os cuidados relativos aos procedimentos são maiores.

Figura 4: Enterobactérias obtidas de amostras coletadas entre abril-setembro/2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC. Quantidade de pontos de coleta, proporção de amostras positivas (positividade) e quantidade de isolados obtidos. Distribuição por unidade hospitalar.



UTI: Unidade de Terapia Intensiva; EMG: Emergência; CMI: Clínica Médica I; CRI: Clínica Cirúrgica I e CC: Centro Cirúrgico. As porcentagens representam as proporções em relação ao número total (N) de amostras analisadas. Entre parênteses estão as quantidades absolutas.

Nas figuras 5-9 estão representadas, para cada unidade hospitalar, em ordem decrescente, as proporções de amostras positivas para enterobactérias encontradas nos diferentes sítios de coleta e a quantidade respectiva de isolados obtidos.

Em todas as unidades de onde foram coletadas amostras de pacientes, os *swabs* retais foram os que apresentaram maior número de isolados e maior proporção de amostras positivas, variando de 83,3% na CRI a 91,7% na CMI e UTI. Os *swabs* nasais tiveram proporções variando de 16,7% na CMI a 41,7% na CRI. As mãos dos pacientes variaram de 8,3% na UTI a 33,3% na CMI.

Nas amostras de profissionais, as vestimentas que apresentaram maior proporção foram dos profissionais da EMG (25%), onde muitos utilizam jalecos próprios e são responsáveis por sua lavagem. A maior proporção de enterobactérias nas mãos de profissionais foram observadas na CRI (33,3%). Somente um telefone celular de um profissional da UTI apresentou contaminação por enterobactéria.

As amostras de ambiente que foram mais preocupantes em todas as unidades, com exceção da CMI, foram as áreas de descanso e alimentação dos profissionais, nas quais as proporções de amostras positivas chegaram a 66,7% na EMG. Esse resultado reforça a necessidade de medidas mais efetivas de cuidado e higienização dessas áreas.

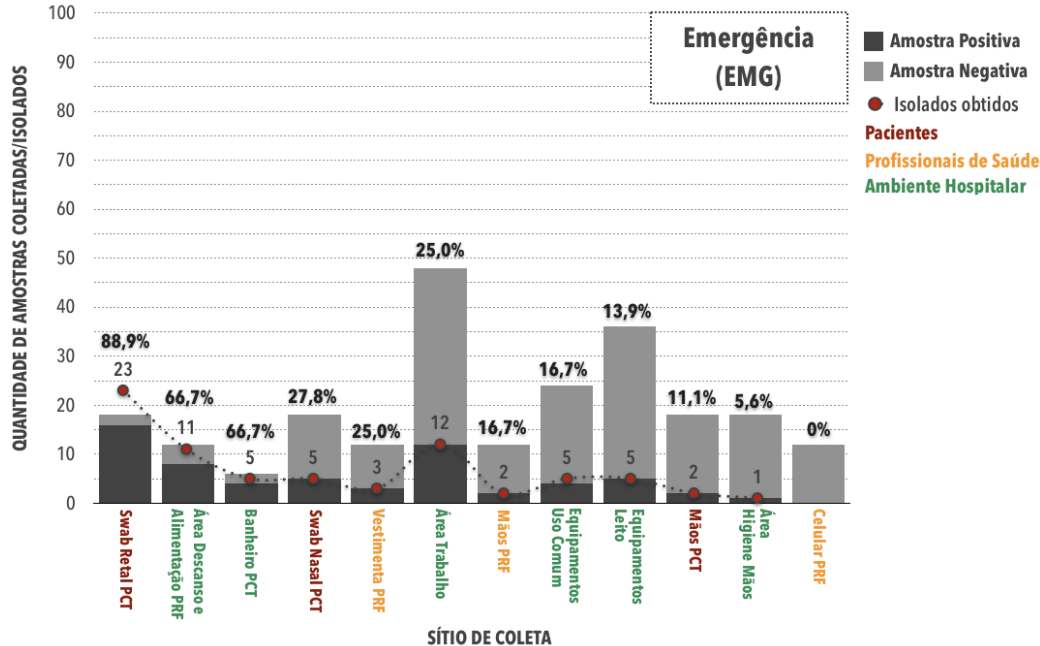
Na EMG e na CRI, depois das áreas de descanso e alimentação, os banheiros dos pacientes apresentaram as maiores proporções de enterobactérias (66,7% e 25%, respectivamente). As amostras foram coletadas somente de superfícies de alto contato, como torneiras, dispensadores de sabonete e botão de descarga. Pelo fato desses banheiros serem geralmente compartilhados entre os pacientes e até mesmo entre visitantes (algo que não é indicado pelo próprio hospital, mas que acontece com frequência), é importante que a higienização e a conscientização sobre seu uso sejam rigorosas, visto que podem servir como fonte de transmissão de bactérias patogênicas.

Na CMI, as maiores proporções em amostras de ambiente foram encontradas nos banheiros dos pacientes (33,3%) e nos equipamentos de leito (20,8%). Como a CMI é uma unidade para onde são direcionados pacientes infectados por bactérias resistentes, as limpezas terminais e concorrentes são ainda mais necessárias.

Na UTI, depois das áreas de descanso e alimentação (50%), estão os equipamentos de leito e de uso comum (13,5% e 8,6%, respectivamente), porém, em comparação com as demais unidades, essas proporções não foram tão altas.

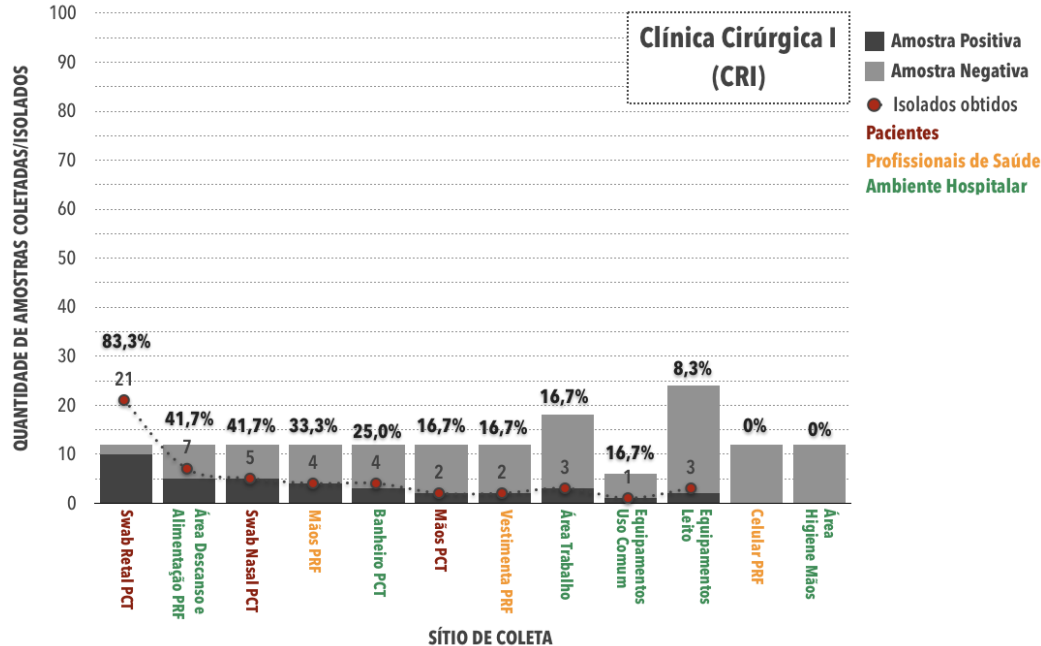
No CC, a unidade que apresentou menor quantidade de enterobactérias, observa-se que a maioria dos isolados é proveniente das áreas de descanso e alimentação dos profissionais. A mesma proporção foi encontrada para os equipamentos de uso comum, que nessa unidade só incluíam macas. As demais áreas dessa unidade apresentaram proporções baixas ou nulas de enterobactérias, como as áreas de trabalho e os equipamentos de leito.

Figura 5: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na unidade de atendimento de emergência (EMG). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



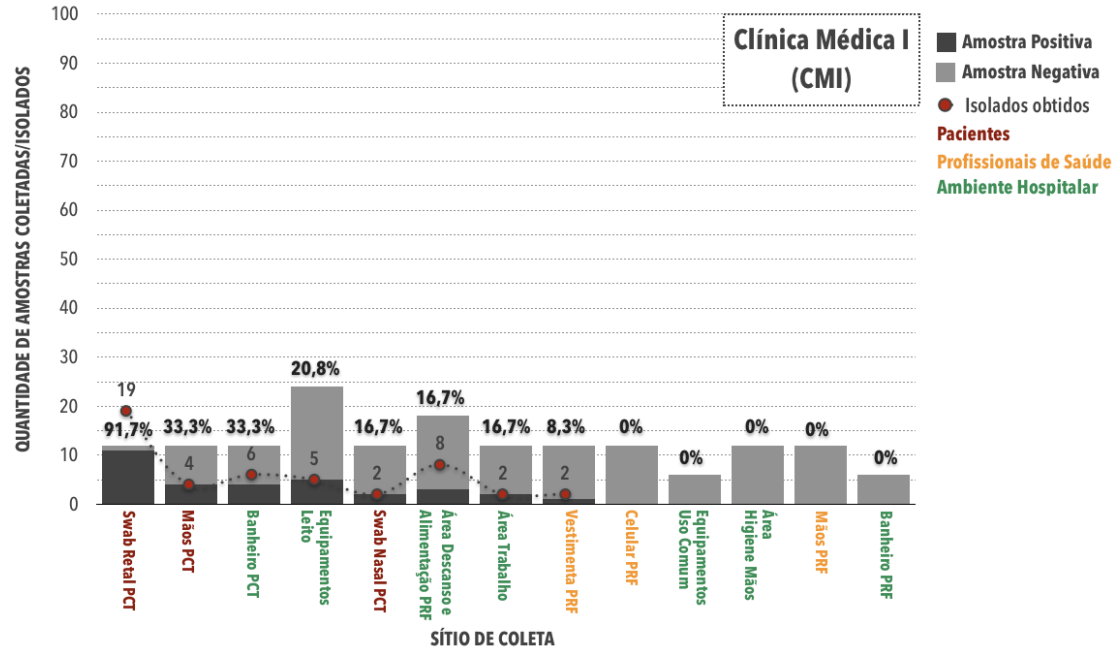
As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

Figura 6: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Clínica Cirúrgica I (CRI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



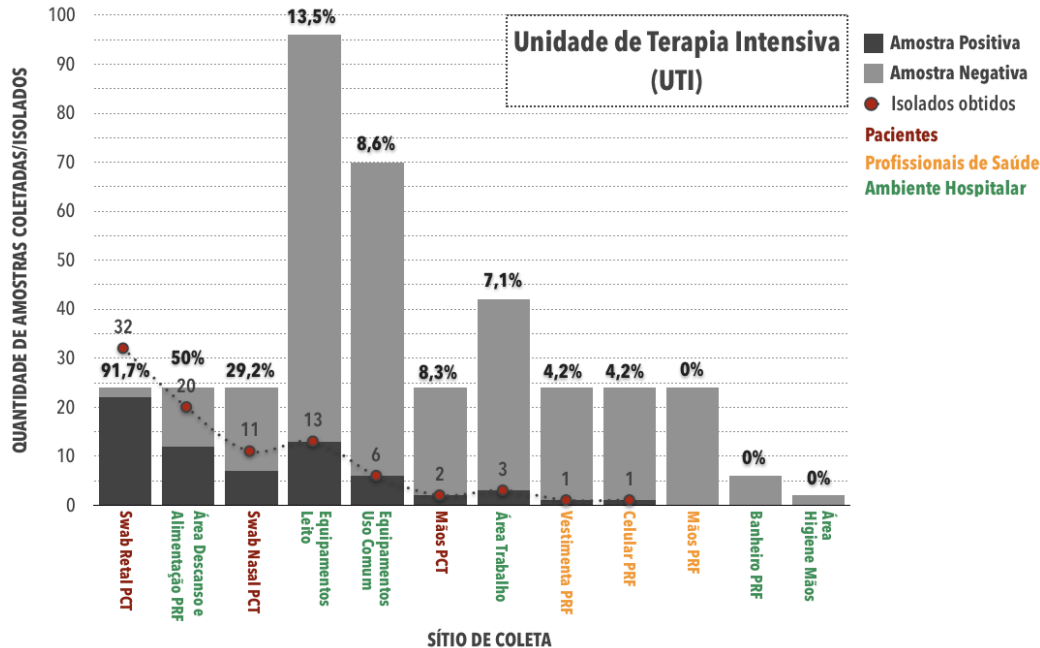
As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

Figura 7: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Clínica Médica I (CMI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



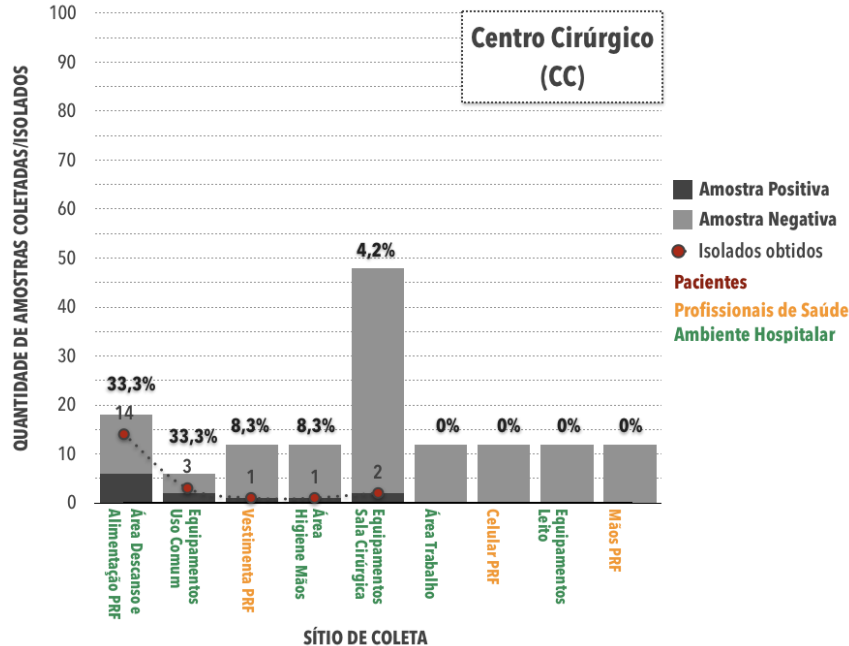
As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

Figura 8: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

Figura 9: Proporção de amostras positivas e quantidade de isolados obtidos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no Centro Cirúrgico (CC). Distribuição nos diferentes sítios de coleta em profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar.



As porcentagens localizadas acima das barras representam as proporções de amostras positivas para *Enterobacteriaceae* em relação ao número total de amostras coletadas.

5.2 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

O primeiro passo para o tratamento e controle de infecções é a identificação rápida e precisa do agente infeccioso. Tradicionalmente, os métodos de identificação microbiológica são fenotípicos e dependentes de técnicas de cultura. No HU-UFSC, por exemplo, assim como em muitos laboratórios de microbiologia clínica, utiliza-se o método automatizado Vitek2[®]. Apesar desses métodos terem uma boa acurácia para a maioria dos patógenos de relevância clínica, eles são métodos relativamente caros e demorados (considerando o tempo para isolamento). Com os avanços científicos e tecnológicos, as técnicas de sequenciamento de DNA estão ficando cada vez mais baratas e rápidas, o que indica que essas técnicas apresentam o potencial de revolucionar a prática clínica, principalmente por não dependerem de técnicas de cultura (DIDELOT *et al.*, 2012). Por isso, estudos de comparação entre métodos fenotípicos e de sequenciamento de DNA são importantes, para que se possa entender as variações, as vantagens e as limitações de ambos os métodos.

5.2.1 Identificação Vitek2[®] e 16S rRNA

Os 284 isolados de enterobactérias obtidos pelo projeto HAIMP foram identificados pelo método fenotípico Vitek2[®]. Esse foi o método utilizado como referência para comparação com outro método de identificação – o sequenciamento de um fragmento da região V3-V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado o padrão ouro nos estudos de filogenia e taxonomia bacteriana, porém, seus resultados podem ser bastante variáveis, pois dependem da região que é sequenciada e dos métodos de análise que são utilizados. Os resultados de identificação de ambos os métodos estão descritos na tabela 2.

As quatro enterobactérias mais frequentemente identificadas pelo método de referência, que perfazem 76,2% de todos os isolados analisados, foram: *Escherichia coli* (57, 20,2%); *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* (55, 19,5%); *Pantoea spp.* (54, 19,1%) e *Enterobacter cloacae complex* (49, 17,4%). Dos 284 isolados, dois não foram analisados pelo sistema Vitek2[®] devido uma falha de processo e três isolados não foram identificados por uma limitação do sistema, que acusou padrão biológico baixo ou não reativo.

O sequenciamento do marcador 16S rRNA foi realizado para os 284 isolados, sendo que para 195 deles (68,7%), as sequências obtidas foram classificadas como uma única espécie. Entretanto, mesmo após a

exclusão de sequências não relevantes, 89 isolados (31,3%) tiveram sequências classificadas para duas ou mais espécies.

Algumas hipóteses que explicam a presença de mais de um tipo de sequência de 16S rRNA na análise de um isolado são: (1) uma mistura de diferentes espécies na mesma amostra sequenciada (isolado não estava suficientemente puro, por exemplo); ou (2) por uma ambiguidade na identificação, que pode ter classificado as diferentes sequências de uma única cepa (variação intragenômica do 16S rRNA) como diferentes espécies, seja por erros de anotação no banco de dados, erros de sequenciamento ou por um baixo poder discriminatório do fragmento analisado.

Sabe-se que o gene 16S rRNA é encontrado em múltiplas cópias no genoma bacteriano, em enterobactérias, por exemplo, é observada uma média de sete cópias por genoma (STODDARD *et al.*, 2015). Estudos relatam que a variação intragenômica entre essas cópias pode ser de 0,06% a 20,38%, dependendo da espécie (PEI *et al.*, 2010). Em *E. coli* essa variação pode ser de 1,10-1,23%, em *K. pneumoniae* de 0,78%, em *Enterobacter sp.* de 0,45%, etc. (KLAPPENBACH *et al.*, 2001; PEI *et al.*, 2010).

A fim de encontrar a melhor hipótese para explicar cada caso em que mais de uma espécie foi identificada no sequenciamento de um isolado, calculou-se as distâncias de nucleotídeos entre as sequências (*pairwise distance*), que está descrita na tabela 2. Essa distância está representada em porcentagem. Como o tamanho do fragmento analisado é de 278 nucleotídeos (nt), uma variação de 0,36% corresponde a um único nucleotídeo de diferença entre as sequências. Quando não há resultado de *pairwise distance* na tabela, é porque o isolado apresentou somente um tipo de sequência.

Para 19 isolados, a hipótese mais provável é que tenha acontecido uma mistura de cepas de diferentes espécies. As distâncias das sequências encontradas para alguns casos foi alta. Quando a mistura era de sequências de alguma *Enterobacteriaceae* com uma bactéria de outra família, como *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas spp.*, a distância das sequências foi de 11,15-16,19%, ou seja, de 31 a 45 nucleotídeos de diferença. Quando a mistura aconteceu entre espécies de enterobactérias, a distância encontrada foi menor, variou de 3,24% (9 nt) entre *K. pneumoniae* e *E. cloacae* a 6,83% (19 nt) entre *Providencia stuartii* e *Proteus mirabilis*.

Para 53 isolados, a hipótese mais provável é que tenha ocorrido ambiguidade na classificação, pois a distância entre as sequências foi baixa, entre 0,36-2,88%, ou seja, de 1 a 8 nucleotídeos, que é uma

variação intragenômica comum. Para os prováveis casos de ambiguidades, adotou-se a classificação baseada no LCA (em inglês, *Least Common Ancestor*). Por exemplo, quando o sequenciamento identificou duas espécies do mesmo gênero, a identificação foi realizada somente a nível de gênero. Dentre as enterobactérias mais comuns, as que apresentaram mais problemas de ambiguidade foram *Pantoea spp.* e *Enterobacter cloacae complex*.

No gênero *Pantoea spp.* pode-se concluir que o fragmento analisado não possui poder discriminatório para fazer a classificação a nível de espécie, já que as variações intra e interespecíficas são similares. Por exemplo, em *P. dispersa*, observou-se variação intra-específica de 0,36-0,72% (1-2 nt), entretanto a mesma variação foi observada para *P. dispersa/P. wallisii* (1-2 nt), *P. ananatis/P. agglomerans* (1 nt), *P. dispersa/P. eucalypti* (2 nt) e *P. ananatis/P. agglomerans* (2 nt). As espécies pertencentes ao gênero *Pantoea* são bioquimicamente heterogêneas e sua identificação é considerada difícil, por isso, conhecer suas relações filogenéticas é importante para se fazer uma identificação correta. As primeiras relações filogenéticas entre as espécies de *Pantoea spp.* foram baseadas na análise completa do gene 16S rRNA, o que já havia mostrado que *P. agglomerans*, *P. ananatis* e *P. stewartii* eram intimamente relacionadas. Em 2009, Delétoile e colaboradores sugeriram um esquema de MLSA (*Multilocus sequence analysis*), que inclui a análise de seis genes independentes (*fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* e *rpoB*), para melhor diferenciar as espécies de *Pantoea* (DELÉTOILE *et al.*, 2009).

Em *E. cloacae complex*, uma ambiguidade que aconteceu com frequência foi entre *Klebsiella oxytoca* e espécies de *Enterobacter* (20/49 – 40,8%), com a distância das sequências variando de 0,36-2,88% (1-8 nt). Uma possível explicação para a identificação de sequências de *Enterobacter* como *K. oxytoca* seria algum erro de anotação dessa última espécie. Entretanto, as mesmas sequências são encontradas em isolados corretamente identificados como *K. oxytoca*, espécie que apresentou uma grande variação intra-específica 0,36-3,24% (1-9 nt). Nesse caso, fica evidente que o fragmento analisado não possui poder discriminatório suficiente para diferenciar *K. oxytoca* de *Enterobacter spp.*. Sugere-se que análises filogenéticas sejam realizadas para analisar a proximidade evolutiva dessas espécies e verificar outras regiões ou marcadores que pudessem fazer essa discriminação de maneira eficiente. No próximo tópico, ao analisar a concordância entre os métodos de identificação, esse assunto será melhor abordado.

Para 17 isolados não foi possível chegar a uma única conclusão, já que tanto uma mistura quanto um problema de ambiguidade podem ter acontecido.

Tabela 2: Identificação fenotípica (Vitek2®) e genotípica (sequenciamento 16S rRNA) dos isolados de enterobactérias obtidos de abril a setembro de 2015 pelo projeto HAIMP no HU-UFSC.

| Vitek2® | | | Sequenciamento 16S rRNA | | | | | |
|--|----|-------|---|----|-------|------------------------------------|-----------------------|-------|
| Identificação | N | % | Classificação das Sequências (>95%) ¹ | N | % | Pairwise distance (%) ² | Hipótese ³ | LCA |
| <i>Escherichia coli</i> | 57 | 20,1% | <i>Escherichia coli</i> | 52 | 18,3% | 0,36 - 0,72 | - | |
| | | | <i>Escherichia coli/Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 0,4% | 14,39 | Mistura | |
| | | | <i>Escherichia coli/Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 0,4% | 12,23 | Mistura | |
| | | | <i>Escherichia coli/Pseudomonas putida</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 11,15 | Mistura | |
| | | | <i>Escherichia coli/Klebsiella oxytoca/Pantoea ananatis/Escherichia sp. KTE31</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 5,40 | Mistura | |
| | | | <i>Escherichia coli/Serratia marcescens</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 5,40 | Mistura | |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> | 55 | 19,4% | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 46 | 16,2% |
| <i>Klebsiella pneumoniae/Acinetobacter baumannii</i> | 2 | 0,7% | | | | 0,36 - 15,47 | Mistura | |
| <i>Klebsiella</i> | 1 | 0,4% | | | | 0,36 - 3,60 | Mistura | |

| | | | | | | | |
|--------------------|----|-------|---|----|-------|-------------|------------------------------------|
| | | | <i>pneumoniae/Enterobacter aerogenes</i> | | | | |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae/Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 3,24 | Mistura |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae/Grimontella senegalensis/Enterobacter asburiae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,24 | Mistura |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae/Klebsiella oxytoca</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade <i>Klebsiella spp.</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter aerogenes/Raoultella ornithinolytica</i> | 1 | 0,4% | 2,52 - 3,96 | Ambiguidade/Mistura |
| <i>Pantoea spp</i> | 54 | 19,0% | <i>Pantoea dispersa</i> | 16 | 5,63% | 0,36 - 0,72 | - |
| | | | <i>Pantoea ananatis</i> | 8 | 2,8% | 0,36 - 6,12 | - |
| | | | <i>Pantoea ananatis/Pseudomonas stutzeri</i> | 1 | 0,4% | 12,95 | Mistura |
| | | | <i>Pantoea agglomerans</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 1,08 | - |
| | | | <i>Pantoea agglomerans/Acinetobacter haemolyticus</i> | 1 | 0,4% | 15,04 | Mistura |
| | | | <i>Pantoea stewartii</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 1,08 | - |
| | | | <i>Pantoea septica</i> | 1 | 0,4% | - | - |
| | | | <i>Pantoea gaviniae</i> | 1 | 0,4% | 0,72 | - |

| | | | | | |
|--|---|------|--------------|---------------------|---------------------|
| <i>Pantoea calida</i> | 1 | 0,4% | 0,36 | - | |
| <i>Pantoea dispersa/Pantoea agglomerans/Pantoea stewartii/Pantoea septica/Pantoea ananatis</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Pantoea septica/Pantoea stewartii</i> | 8 | 2,8% | 0,36 - 1,08 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Pantoea dispersa/Pantoea wallisii</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 0,72 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Pantoea septica/Pantoea agglomerans</i> | 1 | 0,4% | 0,72 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Pantoea dispersa/Pantoea eucalypti</i> | 1 | 0,4% | 0,72 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Pantoea ananatis/Pantoea agglomerans</i> | 3 | 1,1% | 0,36 | Ambiguidade | <i>Pantoea spp.</i> |
| <i>Grimontella senegalensis/Klebsiella pneumoniae/Enterobacter asburiae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,24 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Pantoea ananatis/Pantoea agglomerans/Klebsiella pneumoniae/Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 15,83 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Pantoea stewartii/Pantoea septica/Acinetobacter lwoffii</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 15,04 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Escherichia vulneris/Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0,4% | 3,24 | Mistura | |
| <i>Escherichia vulneris/Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0,4% | 3,24 | Mistura | |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------|--|----|------|-------------|---------------------|----------------------------|
| | | | <i>Pantoea dispersa/Pantoea ananatis/Klebsiella oxytoca/Enterobacter asburiae/Enterobacter cloacae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,16 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 49 | 17,3% | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 18 | 6,3% | 2,52 | - | |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 0,4% | 16,19 | Mistura | |
| | | | <i>Salmonella enterica</i> | 4 | 1,4% | 0,36 | - | |
| | | | <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 | 1,1% | 0,36 - 3,96 | - | |
| | | | <i>Enterobacter cloacae/Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0,4% | 0,36 | Ambiguidade | <i>Enterobacter spp.</i> |
| | | | <i>Enterobacter aerogenes/Kluyvera ascorbata</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 0,72 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae</i> | 13 | 4,6% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter asburiae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae/Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter hormaechei</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Enterobacter cloacae/Klebsiella oxytoca/Klebsiella pneumoniae</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 5,76 | Ambiguidade/Mistura | |

| | | | | | | | | |
|---------------------------------|----|------|--|----|------|--------------|---------------------|----------------------------|
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae/Serratia marcescens/Serratia ureilytica</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 6,83 | Ambiguidade/Mistura | |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Escherichia coli/Pantoea ananatis/Escherichia sp. KTE31</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 5,40 | Ambiguidade/Mistura | |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Pantoea dispersa/Pantoea ananatis/Enterobacter asburiae/Enterobacter cloacae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,60 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Serratia marcescens</i> | 15 | 5,3% | <i>Serratia marcescens</i> | 13 | 4,6% | 0,36 - 1,08 | - | |
| | | | <i>Serratia marcescens/Escherichia coli</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 5,40 | Mistura | |
| | | | <i>Serratia marcescens/Pseudomonas stutzeri</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 12,88 | Mistura | |
| <i>Leclercia adecarboxylata</i> | 9 | 3,2% | <i>Salmonella enterica</i> | 4 | 1,4% | 0,36 - 1,08 | - | |
| | | | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| | | | <i>Salmonella enterica/Leclercia adecarboxylata</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 1,08 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Escherichia vulneris/Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0,4% | 3,24 | Ambiguidade/Mistura | |
| | | | <i>Enterobacter aerogenes/Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,24 | Ambiguidade/Mistura | |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|------|--|---|------|--------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 7 | 2,5% | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 6 | 2,1% | 0,36 - 3,24 | - | |
| | | | <i>Salmonella enterica/Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0,4% | 2,16 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 7 | 2,5% | <i>Proteus mirabilis</i> | 7 | 2,5% | 0,36 - 0,72 | - | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 3 | 1,1% | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2 | 0,7% | 0,36 - 1,08 | - | |
| | | | <i>Enterobacter aerogenes/Kluyvera ascorbata</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 1,08 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 3 | 1,1% | <i>Enterobacter amnigenus /Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0,4% | 2,52 | Ambiguidade | <i>Enterobacter spp.</i> |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae/Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,24 | Ambiguidade/Mistura | |
| | | | <i>Serratia marcescens/Cronobacter sakazakii/Citrobacter koseri</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 5,04 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Raoultella planticola</i> | 3 | 1,1% | <i>Raoultella ornithinolytica/Kluyvera ascorbata</i> | 1 | 0,4% | 0,72 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Pantoea agglomerans/Enterobacter aerogenes/Klebsiella oxytoca/Enterobacter cancerogenus</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 3,24 | Ambiguidade/Mistura | |
| | | | <i>Raoultella ornithinolytica/Kluyvera ascorbata/Enterobacter aerogenes/Pseudomonas putida</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 14,03 | Ambiguidade/Mistura | |

| | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|------|--|---|------|-------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | 2 | 0,7% | <i>Kluyvera intermedia</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| | | | <i>Enterobacter aerogenes/Citrobacter murlinae</i> | 1 | 0,4% | 1,44 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Serratia liquefaciens group</i> | 2 | 0,7% | <i>Serratia proteamaculans/Serratia liquefaciens</i> | 1 | 0,4% | 2,16 | Ambiguidade | <i>Serratia spp.</i> |
| | | | <i>Serratia proteamaculans/Serratia liquefaciens/Enterobacter cloacae/Enterobacter aerogenes/Averyella dalhousiensis</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 8,99 | Ambiguidade/Mistura | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 0,4% | <i>Citrobacter werkmanii/Kluyvera intermedia/Citrobacter freundii</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 1,80 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 0,4% | <i>Cronobacter sakazakii/Citrobacter koseri</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 0,72 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Citrobacter sedlakii</i> | 1 | 0,4% | <i>Citrobacter rodentium</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> | 1 | 0,4% | <i>Pluralibacter gergoviae/Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0,4% | 0,36 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Escherichia fergusonii</i> | 1 | 0,4% | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| <i>Escherichia vulneris</i> | 1 | 0,4% | <i>Enterobacter hormaechei/Enterobacter cloacae/Salmonella enterica</i> | 1 | 0,4% | 0,72 - 1,44 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Kluyvera</i> | 1 | 0,4% | <i>Klebsiella oxytoca/Pantoea</i> | 1 | 0,4% | 1,44 - 3,60 | Ambiguidade/Mistura | <i>Enterobacteria</i> |

| | | | | | | | | |
|---|---|------|--|---|------|-------------|-------------|----------------------------|
| <i>intermedia</i> | | | <i>dispersa/Pantoea ananatis</i> | | | | <i>ceae</i> | |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | 1 | 0,4% | <i>Pantoea dispersa</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| <i>Proteus vulgaris group/Proteus penneri</i> | 1 | 0,4% | <i>Proteus penneri</i> | 1 | 0,4% | - | - | |
| <i>Providencia stuartii</i> | 1 | 0,4% | <i>Providencia stuartii/Proteus mirabilis</i> | 1 | 0,4% | 6,83 | Mistura | |
| <i>Serratia odorifera</i> | 1 | 0,4% | <i>Lelliottia amnigena/Kluyvera intermedia</i> | 1 | 0,4% | 0,36 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| <i>Serratia rubidaea</i> | 1 | 0,4% | <i>Serratia marcescens/Pseudomonas stutzeri</i> | 1 | 0,4% | 13,7 | Mistura | |
| <i>Yersinia enterocolitica group</i> | 1 | 0,4% | <i>Enterobacter cloacae/Escherichia vulneris/Salmonella enterica</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,16 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| Não analisado | 2 | 0,7% | <i>Klebsiella oxytoca/Enterobacter cloacae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,88 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,52 | - | |
| Não identificado | 3 | 1,1% | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 0,72 | - | |
| | | | <i>Escherichia hermannii/Kosakonia sacchari</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 1,08 | Ambiguidade | <i>Enterobacteria ceae</i> |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 0,4% | 0,36 - 2,52 | - | |

| | | | |
|-------|----------|--|----------|
| TOTAL | 284 100% | | 284 100% |
|-------|----------|--|----------|

LCA: *Least Common Ancestor*

¹ Só foram consideradas sequências que somadas perfizeram pelo menos 95% de todas as sequências.

² Isolados que só apresentaram um tipo de sequência foram indicados com hífen (“-”).

³ MISTURA: Hipótese de que sequências de DNA de mais de uma espécie estavam presentes na amostra sequenciada;

AMBIGUIDADE: Hipótese de que as diferentes sequências encontradas numa amostra não sejam de espécies diferentes, mas sim uma variação intragenômica no 16S rRNA de uma única cepa, portanto, houve ambiguidade de identificação, seja por erros de anotação no banco de dados, erros de sequenciamento ou por um baixo poder discriminatório do fragmento analisado.

MISTURA/AMBIGUIDADE: Quando não foi possível concluir a melhor hipótese.

5.2.1.1 Análise de Concordância - Vitek2[®] vs. 16S rRNA

Para realizar as análises de concordância dos resultados de identificação microbiológica obtidos pelo sistema Vitek2[®] e sequenciamento do 16S rRNA, só foram considerados os isolados que apresentaram resultados de mesmo nível taxonômico para ambos os métodos. Por exemplo, os isolados de *Enterobacter cloacae complex* só foram comparados à nível de gênero, pois englobam mais de uma espécie de *Enterobacter*.

Dos 279 isolados que foram identificados pelos dois métodos, 136 (48,8%) foram comparados a nível de espécie e 213 (76,3%) a nível de gênero. Na tabela 3 está representada a matriz de concordância entre os 136 isolados que apresentaram resultados a nível de espécie para ambos os métodos de identificação.

A grande maioria (93,4% - 127/136) dos isolados comparados apresentaram concordância de espécie, entretanto, nove isolados (6,6% - 9/136) apresentaram resultados discordantes. Três deles foram concordantes para pelo menos gênero e cinco deles foram concordantes somente a nível de família. Na comparação de espécies, as discordâncias encontradas foram (em negrito está a identificação pelo sistema Vitek2[®]):

- Discordâncias de gênero:
 - o ***Leclercia adecarboxylata*** com *Salmonella enterica* ou *Enterobacter aerogenes*.
 - o ***Enterobacter amnigenus*** com *Kluyvera intermedia*.
- Discordâncias de espécie, mas concordância para gênero:
 - o ***Escherichia fergusonii*** com *E. coli*.
 - o ***Citrobacter sedlakii*** com *C. rodentium*.
 - o ***Pantoea agglomerans*** com *P. dispersa*.

Na tabela 4 está representada a matriz de concordância a nível de gênero. Dos 213 isolados analisados, 184 (86,4%) foram concordantes e 29 (13,6%) foram discordantes. As discordâncias nas comparações de gênero foram:

- ***Enterobacter*** com *Klebsiella*, *Salmonella* ou *Kluyvera*.
- ***Leclercia*** com *Salmonella* ou *Enterobacter*.
- ***Raoultella*** com *Enterobacter*.

Tabela 3: Matriz de concordância entre identificação pelo sistema Vitek2® e sequenciamento do marcador 16S rRNA a nível de espécie.

| Concordância a nível de espécie | | | | | | | | | | | | | | | | Concordância a nível de gênero | | | | | | | | | | | | | | | | Concordância a nível de família | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------|------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|------------|----|-------------------------------|----|-------------------------------|----|-------------------------------|----|-------------------------------|----|-----------------------------|----|---------------------------------|----|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 16S rRNA | Vitek2® | | | | | | | | | | | | | | | | TOTAL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ec | Kp | Sm | Pm | Ko | La | Se | Ee | Cr | Ki | Pd | Pp | Cs | Em | Ef | Pa | | Ec | Kp | Sm | Pm | Ko | La | Se | Ee | Cr | Ki | Pd | Pp | Cs | Em | Ef | Pa | | | | | | | | | | | | | | |
| Ec | 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 53 (39,0%) | Ec | <i>Escherichia coli</i> | Kp | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Sm | <i>Serratia marcescens</i> | Pm | <i>Proteus mirabilis</i> | Ko | <i>Klebsiella oxytoca</i> | La | <i>Leclercia adecarboxylata</i> | Se | <i>Salmonella enterica</i> | Ee | <i>Enterobacter aerogenes</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Kp | 0 | 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 (33,8%) | Cr | <i>Citrobacter rodentium</i> | Ki | <i>Kluyvera intermedia</i> | Pd | <i>Pantoea dispersa</i> | Pp | <i>Proteus penneri</i> | Cs | <i>Citrobacter sedlakii</i> | Em | <i>Enterobacter amnigenus</i> | Ef | <i>Escherichia fergusonii</i> | Pa | <i>Pantoea agglomerans</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Sm | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 (9,6%) | Pp | <i>Proteus penneri</i> | Cs | <i>Citrobacter sedlakii</i> | Em | <i>Enterobacter amnigenus</i> | Ef | <i>Escherichia fergusonii</i> | Pa | <i>Pantoea agglomerans</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pm | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (5,1%) | Em | <i>Enterobacter amnigenus</i> | Ef | <i>Escherichia fergusonii</i> | Pa | <i>Pantoea agglomerans</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ko | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 (4,4%) | Pa | <i>Pantoea agglomerans</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| La | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Se | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 (2,9%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ee | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 (2,2%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cr | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 (0,7%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ki | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 (0,7%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 (0,7%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pp | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0,7%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cs | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Em | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ef | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TOTAL | 52 (38,2%) | 46 (33,8%) | 13 (9,6%) | 7 (5,1%) | 6 (4,4%) | 5 (3,7%) | 0 (0,0%) | 2 (1,5%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) | 136 (100%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabela 4: Matriz de concordância entre identificação pelo sistema Vitek2® e sequenciamento do marcador 16S rRNA a nível de gênero.

| 16S rRNA | Concordância a nível de gênero | | | | | | | | | | TOTAL | |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|---------------------|-----------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------|
| | Concordância a nível de família | | | | | | | | | | | |
| | Vitek® | | | | | | | | | | | |
| | <i>Klebsiella</i> | <i>Escherichia</i> | <i>Pantoea</i> | <i>Citrobacter</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Kluyvera</i> | <i>Leclercia</i> | <i>Proteus</i> | <i>Raoultella</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Serratia</i> | |
| <i>Klebsiella</i> | 54 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 (33,8%) |
| <i>Escherichia</i> | 0 | 53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 (24,9%) |
| <i>Pantoea</i> | 0 | 0 | 47 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 (22,1%) |
| <i>Citrobacter</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0,5%) |
| <i>Enterobacter</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 8 (3,8%) |
| <i>Kluyvera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0,5%) |
| <i>Leclercia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) |
| <i>Proteus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 (3,8%) |
| <i>Raoultella</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0%) |
| <i>Salmonella</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 (3,8%) |
| <i>Serratia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 (7,0%) |
| TOTAL | 54 (25,4%) | 53 (24,9%) | 47 (22,1%) | 1 (0,5%) | 29 (13,6%) | 0 (0,0%) | 5 (2,3%) | 8 (3,8%) | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) | 15 (7,0%) | 213 (100%) |

Os resultados das análises de concordância a nível de espécie e de gênero foram excelentes: $K = 0,908$ (90,8%) para espécie e $K = 0,828$ (82,8%) para gênero. Um estudo publicado em 2015 também comparou a identificação feita por métodos tradicionais e por sequenciamento do 16S rDNA, no qual verificou-se uma concordância de 87,5% para espécie e 96% para gênero (SRINIVASAN *et al.*, 2015). No presente trabalho, a concordância de gênero, apesar de excelente, não foi tão alta devido às discordâncias entre *Enterobacter* e *Klebsiella*.

Existem diversos fatores que poderiam explicar as discordâncias encontradas, alguns deles são: (1) erros de anotação ou baixa representatividade de sequências no banco de dados; (2) baixo poder discriminatório do fragmento analisado; (3) identificação fenotípica incorreta.

A espécie *E. coli* foi a mais abundante nesse estudo ($n = 57$). Retirando as amostras que apresentaram misturas com outras espécies no sequenciamento ($n = 5$), todos os isolados tiveram resultados concordantes, não sendo observada nenhuma ambiguidade. Uma ambiguidade clássica reportada por alguns estudos é entre 16S rRNA de *E. coli* e *Shigella spp.* (SIMMON; CROFT; PETTI, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 2015), porém, isso não aconteceu para os isolados de *E. coli* analisados nesse trabalho. Entretanto, como não foram analisados isolados de *Shigella spp.*, não se pode afirmar que esse mesmo problema de ambiguidade não ocorreria para esse gênero. Uma única discordância foi encontrada para um isolado de *Escherichia fergusonii*, que foi classificado como *E. coli*. Nesse caso, a sequência encontrada é idêntica às sequências encontradas na maioria dos isolados de *E. coli*, portanto, há duas hipóteses mais prováveis para explicar essa discordância: baixo poder discriminatório do fragmento analisado ou erro na identificação fenotípica.

K. pneumoniae foi a segunda espécie mais abundante nesse trabalho. Um fato interessante é que mesmo apresentando uma grande variação intra-específica de sequências (0,36-2,52%, 1-7 nt), essa espécie apresentou altas taxas de concordância. Só foram observadas possíveis ambiguidades para três dos 55 isolados. Dois deles foram classificados como *K. pneumoniae*/*K. oxytoca* e um deles não apresentou sequências de *K. pneumoniae*, mas apresentou sequências de *K. oxytoca*, *E. aerogenes* e *Raoultella ornithinolytica*. Para esse caso não foi possível definir a hipótese mais provável, se mistura de mais de uma cepa ou ambiguidade, pois a distância das sequências foi de 2,52-3,96% (7-11 nt).

Pantoea spp. foi a terceira enterobactéria mais abundante nas amostras analisadas. Como citado anteriormente, esses isolados apresentaram altas taxas de ambiguidade e, apesar de vários isolados terem sido classificados a nível de espécie, o fragmento analisado não possui poder discriminatório suficiente para identificar além de gênero. Porém, entre os 47 isolados que tiveram suas identificações a nível de gênero comparadas, houve perfeita concordância entre Vitek2® e 16S rRNA.

Ambiguidades e discordâncias foram encontradas para *Leclercia adecarboxylata*. A maioria desses isolados foram identificados como *Salmonella enterica* ou uma combinação de *S. enterica* com *L. adecarboxylata*. Algumas hipóteses para explicar esses problemas de identificação são baixo poder discriminatório do fragmento, erros de anotação ou baixa representatividade de sequências de *L. adecarboxylata* no banco de dados.

Dentre as enterobactérias menos frequentes, observou-se concordância para isolados de *Serratia marcescens*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* e *Proteus penneri*. Ambiguidades e discordâncias também foram verificadas, porém, devido ao baixo número de isolados, não é possível fazer conclusões efetivas.

Bactérias do complexo *Enterobacter cloacae* estão entre as mais frequentemente isoladas nas amostras analisadas. Porém, a maior parte delas apresentou identificações discordantes ou ambíguas pelo 16S rRNA:

Enterobacter cloacae complex (Vitek2®; N = 49):

- N = 24 (48,9%): Identificação ambígua
 - o As principais espécies encontradas nesses casos foram *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae* (61,2%, $p < 0,0001$). *Klebsiella oxytoca* foi detectada em 91,7% (22/24) dos isolados e *Enterobacter cloacae* foi detectada em 79,2% (19/24).
- N = 18 (36,7%): *Klebsiella oxytoca*;
- N = 4 (8,2%): *Salmonella enterica*;
- N = 3 (6,1%): *Enterobacter cloacae*.

A taxonomia do gênero *Enterobacter* possui uma história longa e confusa, com diversas transferências de espécies ocorridas nas últimas duas décadas. Sabe-se que as espécies do complexo *E. cloacae* são geneticamente heterogêneas e incluem: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* e *E. nimipressuralis*. Baseado na análise do 16S

rRNA, o gênero *Enterobacter* mostrou ser polifilético, assim como outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Por isso, a classificação de diferentes cepas a nível de espécie é desafiadora. Diversos estudos relatam dificuldades na identificação desse gênero (BRADY *et al.*, 2013; CHAVDA, 2016; HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003; JANDA; ABBOTT, 2007). Outro marcador utilizado como uma alternativa para identificação de *Enterobacter* é o sequenciamento do gene *rpoB*, já que ele fornece uma maior resolução filogenética quando comparado com o 16S rRNA. Porém, mesmo com essa maior resolução, o *rpoB* também apresenta limitações para determinar relações filogenéticas próximas (BRADY *et al.*, 2013).

Para confirmar a identificação dos 49 isolados de *Enterobacter cloacae complex* e verificar a acurácia de outros métodos, esses isolados também foram submetidos à identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento do gene *rpoB*.

5.2.2 Identificação MALDI-TOF

Nos últimos anos houve um aumento no uso da espectrometria de massas para identificação bacteriana, devido sua eficiência, rapidez e baixo custo por amostra (GUO *et al.*, 2014; SINGHAL *et al.*, 2015).

Um total de 47 isolados, que haviam sido anteriormente identificados como *Enterobacter cloacae complex* pelo Vitek2[®] foram também identificados pela metodologia de MALDI-TOF utilizando o equipamento Vitek[®] MS, os resultados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Identificação fenotípica realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF - Vitek[®] MS) dos isolados de *Enterobacter cloacae complex*.

| NÍVEL TAXONÔMICO | LCA | MALDI-TOF VITEK [®] MS | N (%) |
|------------------|-------------------------------------|---|---------------|
| Complexo | <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 50% <i>Enterobacter cloacae</i> e 50% <i>Enterobacter asburiae</i> | 36 (76,6%) |
| - | NI | - | 7 (14,9%) |
| Gênero | <i>Bacillus spp.</i> | 33,3% <i>Bacillus mycoides</i> , 33,3% <i>Bacillus thuringiensis</i> , 33,3% <i>Bacillus cereus</i> | 2 (4,3%) |
| Espécie | <i>Pseudomonas putida</i> | 97,7% <i>Pseudomonas putida</i> | 1 (2,1%) |
| Espécie | <i>Citrobacter koseri</i> | 81,3% <i>Citrobacter koseri</i> | 1 (2,1%) |
| TOTAL | | | 47 |

(100%)

LCA: *Least Common Ancestor*

A maioria dos isolados analisados (76,6% - 36/47) foi identificada como *Enterobacter cloacae complex*, demonstrando concordância com o resultado do Vitek2[®]. A metodologia de espectrometria de massas também só chegou ao nível de complexo, já que não houve resolução suficiente para distinguir entre *E. cloacae* e *E. asburiae*. Observou-se discordâncias para 8,6% dos isolados analisados: dois foram identificados como *Bacillus spp.*, um como *Pseudomonas putida* e um como *Citrobacter koseri*. Três discordâncias foram a nível de família e uma a nível de gênero. Para sete isolados (14,9%) não possível emitir resultados de identificação.

Um estudo de 2014, que comparou a identificação de micro-organismos feita pelo sistema Vitek2[®] e Vitek[®] MS, reportou discordâncias para todos os isolados de *E. cloacae* analisados (n = 46), porém, isso não é bem discutido no trabalho. Essa discordância provavelmente se deu pelo fato de ambos os métodos não fornecerem resultados a nível de espécie.

Apesar do MALDI-TOF também não ter fornecido resultados a nível de espécie, confirmou-se a identificação de 36 dos 49 isolados como *E. cloacae complex*.

5.2.3 Identificação *rpoB*

O sequenciamento do gene *rpoB* foi realizado para 48 isolados que haviam sido identificados anteriormente como *Enterobacter cloacae complex* pelo sistema Vitek2[®]. Os resultados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Identificação genotípica realizada por sequenciamento do gene *rpoB* dos isolados de *Enterobacter cloacae complex*.

| UNIDADE TAXONÔMICA | LCA | RESULTADO BLAST (≥99% DE ID) | N | N (%) |
|--------------------|-------------------------------------|---|----|---------------|
| Complexo | <i>Enterobacter cloacae complex</i> | <i>E. hormaechei</i> ; <i>E. cloacae</i> | 16 | |
| | | <i>E. cloacae</i> ; <i>E. kobei</i> | 3 | 24 |
| | | <i>E. cloacae</i> ; <i>E. asburiae</i> | 3 | (50%) |
| | | <i>E. cloacae complex</i> | 2 | |
| Gênero | <i>Enterobacter spp.</i> | <i>E. xiangfangensis</i> ; <i>E. hormaechei</i> | 14 | 18 (37,5%) |

| | | | | |
|--------------|-----------------------------|---|---|--------------|
| | | <i>Enterobacter spp.</i> | 3 | |
| | | <i>E. soli</i> ; <i>E. mori</i> ; <i>E. cloacae</i> | 1 | |
| Espécie | <i>Enterobacter cloacae</i> | - | 5 | 5 (10,4%) |
| Espécie | <i>Enterobacter soli</i> | - | 1 | 1 (2,1%) |
| TOTAL | | | | 48 (100%) |

LCA: *Least Common Ancestor*

ID: Identidade

Todos os 48 isolados foram identificados dentro do gênero *Enterobacter*, entretanto, alguns isolados apresentaram sequências que tiveram pelo menos 99% de identidade com mais de uma espécie de *Enterobacter*. Nesses casos, adotou-se a classificação baseada no LCA, o que fez com que 50% dos isolados fossem identificados dentro do complexo *E. cloacae* (24/48) e 37,5% identificados *Enterobacter spp.*, já que algumas espécies identificadas não são consideradas do complexo *cloacae*, como *E. xiangfangensis*, *E. soli* e *E. mori*. Para seis isolados (12,5%) o *rpoB* teve resolução suficiente para realizar a identificação a nível de espécie (*E. cloacae* e *E. soli*), porém, essas identificações precisariam ser confirmadas por outros métodos.

O sequenciamento do gene *rpoB* se mostrou mais eficiente que o 16S rRNA para identificação de *Enterobacter cloacae complex*, assim como já afirmado por Brady e colaboradores em 2013. Por ser um gene de cópia única, não foi observado o mesmo problema de ambiguidade que ocorreu no sequenciamento do 16S rRNA, quando cópias diferentes de uma mesma cepa acabavam sendo classificadas como espécies diferentes (*K. oxytoca* e *E. cloacae*, por exemplo).

5.3 ABUNDÂNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS

As enterobactérias mais abundantes encontradas nesse estudo de rastreamento no HU-UFSC, que coletou amostras de pacientes, profissionais de saúde e ambiente, foram: *Escherichia coli* (20,1%), *Klebsiella pneumoniae* (19,4%), *Pantoea spp.* (19,0%) e *Enterobacter cloacae complex* (17,3%).

Um estudo epidemiológico foi realizado entre os anos de 2006 e 2008 no HU-UFSC. Esse estudo analisou 869 bactérias isoladas de pacientes com infecção e mostrou que aproximadamente 54% eram da

família *Enterobacteriaceae*, sendo as mais prevalentes: *E. coli* (14,7%), *Enterobacter spp.* (11,7%) e *Klebsiella pneumoniae* (13,6%). As menos prevalentes (13,6%) foram: *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* e *Morganella morganii* (PARUCKER, 2010). Observa-se que, com exceção de *Pantoea spp.*, as enterobactérias mais abundantes no presente estudo são também as mais frequentemente isoladas de pacientes infectados no HU-UFSC.

E. coli, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* são considerados importantes patógenos oportunistas. *E. coli* é a bactéria mais comumente associada a infecções do trato urinário, tanto em infecções comunitárias como em IRAS. *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* são frequentemente associadas a pneumonias nosocomiais, principalmente em pacientes internados por um período prolongado (LIVERMORE, 2012). *Pantoea* é um gênero que inclui várias espécies geralmente associadas a plantas e algumas espécies podem causar doença em humanos. *Pantoea agglomerans* é a espécie mais comumente isolada de humanos, sendo considerada um patógeno oportunista, ocorrendo esporadicamente ou em surtos (DELÉTOILE *et al.*, 2009).

5.3.1 Abundância de Enterobactérias Por Fonte de Coleta

Na figura 10 está representada a abundância de enterobactérias identificadas nos diferentes sítios de coleta. Só foram consideradas as bactérias identificadas pelo sistema Vitek2[®] e os isolados NA (não analisados), não foram considerados. Foi observada uma média de 6,3 OTUs (do inglês, *Operational Taxonomic Units* - Unidades Taxonômicas Operacionais) por sítio de coleta.

Das enterobactérias mais abundantes, a maioria das *E. coli* foram encontradas em pacientes (93%), principalmente nos *swabs* retais. Os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram distribuição similar entre pacientes (52,7%) e ambiente (43,6%). A maioria das *Pantoea spp.* foram encontradas em amostras de ambiente (90,7%), somente uma *Pantoea spp.* foi isolada da mão de um paciente. Os isolados de *E. cloacae complex* apresentaram distribuição similar entre ambiente (51%) e pacientes (40,8%).

Nos pacientes, a enterobactéria mais frequente nos *swabs* retais (n = 94) foi *E. coli* (53,2%), seguida de *K. pneumoniae* (21,3%) e *E. cloacae complex* (11,7%).

Nos *swabs* nasais (n = 23), as mais frequentes foram do gênero *Serratia spp.* (26,1%) e *E. cloacae complex* (21,7%), diferentemente dos *swabs* nasais de uma população alemã, que encontrou *K. oxytoca*, *E. coli*

e *Proteus mirabilis* como as enterobactérias mais abundantes (KOCK *et al.*, 2016).

Nas mãos dos pacientes (n = 10) as enterobactérias mais abundantes foram *E. cloacae complex* (40%) e *K. pneumoniae* (20%).

Nas amostras de profissionais, as enterobactérias mais frequentes nas vestimentas (n = 9) foram *Pantoea spp.* (33,3%), *E. cloacae complex* (22,2%) e *K. pneumoniae* (22,2%).

Nas mãos dos profissionais (n = 6) foram encontradas bactérias do gênero *Serratia spp.* (33,3%), *Pantoea spp.* (16,7%), *E. cloacae complex* (16,7%), *Leclercia adecarboxylata* (16,7%) e *Escherichia vulneris* (16,7%).

Somente um telefone celular de profissional foi positivo para alguma enterobactéria, que foi identificada como *E. cloacae complex*.

Nas amostras de ambiente hospitalar, as áreas de descanso e alimentação (n = 57) apresentaram 26,3% de isolados de *Pantoea spp.*, 26,3% de *K. pneumoniae* e 21,1% de *E. cloacae complex*. As mesmas bactérias foram as mais frequentes em equipamentos de leito (n = 25): 36%, 24% e 20%, respectivamente.

Nas áreas comuns de trabalho dos profissionais (n = 20), 75% das bactérias foram identificadas como *Pantoea spp.*

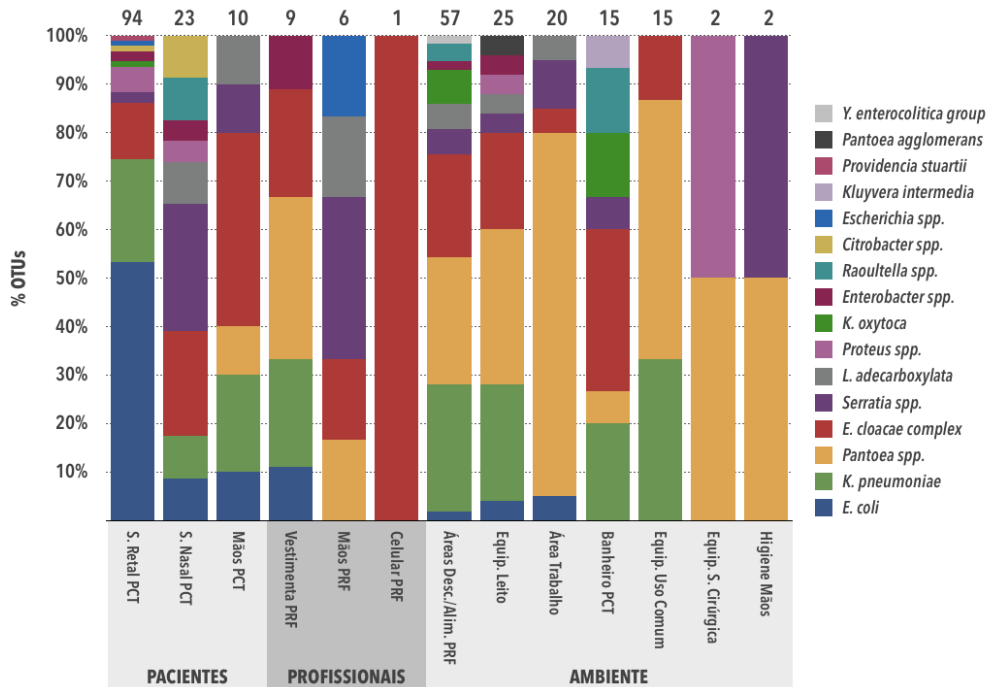
Nos banheiros dos pacientes (n = 15), as mais frequentes foram *E. cloacae complex* (33,3%) e *K. pneumoniae* (20%).

Nos equipamentos de uso comum (n = 15), 53,3% dos isolados foram *Pantoea spp.*, 33,3% *K. pneumoniae* e 13,3% *E. cloacae complex*.

Nos equipamentos da sala cirúrgica, somente duas amostras foram positivas para alguma enterobactéria, uma delas foi identificada como *Pantoea spp.* e a outra como *Proteus mirabilis*.

Por fim, nas amostras das áreas de higiene de mãos, as únicas duas bactérias identificadas foram *Pantoea spp.* e *Leclercia adecarboxylata*.

Figura 10: Distribuição da abundância de enterobactérias identificadas no HU-UFSC por sítio de coleta.



Os valores localizados acima das barras representam a quantidade total de isolados de *Enterobacteriaceae* encontrados em cada sítio de coleta.

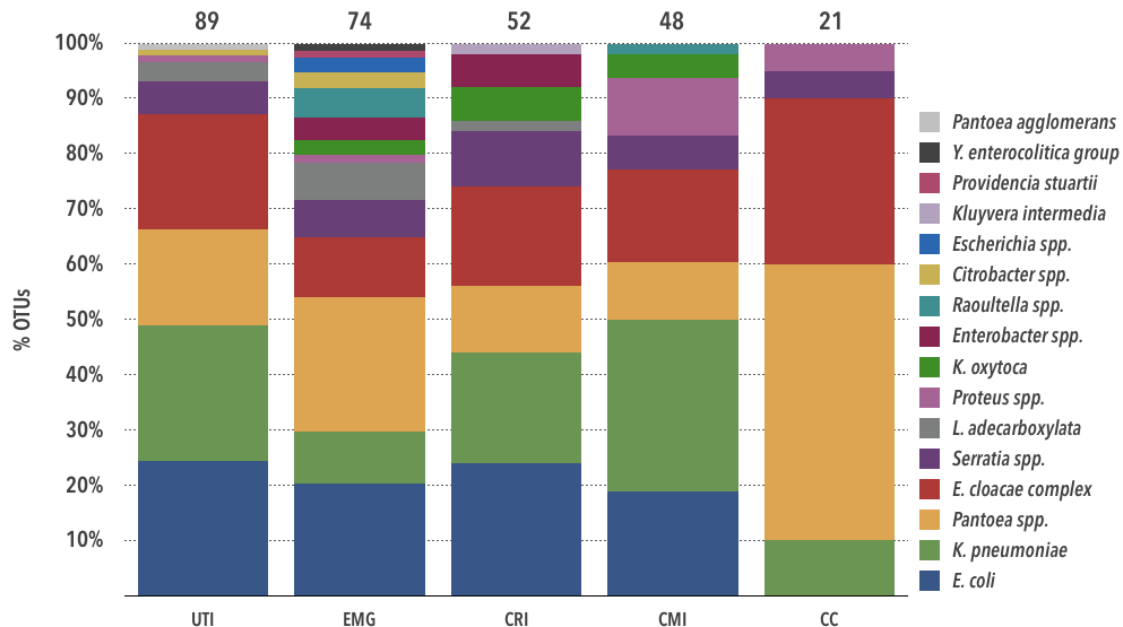
5.3.2 Abundância de Enterobactérias Por Unidade Hospitalar

Na figura 11 está representada a abundância encontrada nas diferentes unidades hospitalares. Pode-se observar que o perfil foi bastante semelhante.

Dentre as espécies mais frequentes, *E. coli* só não foi encontrada no CC, provavelmente por não terem sido coletadas amostras de pacientes nessa unidade.

A EMG foi a unidade que apresentou maior variação de enterobactérias, com 14 OTUs identificadas. Isso pode ser explicado por ser uma unidade com grande circulação diária de pessoas, portanto, a diversidade microbiana encontrada nesse local deve refletir aquela encontrada na comunidade. Um estudo que comparou a diversidade microbiológica geral entre EMG e UTI, encontrou uma biodiversidade muito maior na EMG (POZA *et al.*, 2012).

Figura 11: Distribuição da abundância de enterobactérias identificadas no HU-UFSC por unidade hospitalar.



Os valores localizados acima das barras representam a quantidade total de isolados de *Enterobacteriaceae* encontrados em cada unidade hospitalar. UTI: Unidade de Terapia Intensiva; EMG: Emergência; CMI: Clínica Médica I; CRI: Clínica Cirúrgica I e CC: Centro Cirúrgico.

5.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência de bactérias patogênicas a diversos agentes antimicrobianos se tornou uma grande ameaça à saúde pública. As enterobactérias produtoras de ESBL e as resistentes aos carbapenêmicos são classificadas pelo CDC como um problema sério e urgente de saúde pública, respectivamente (CDC, 2013). Pacientes infectados por esses patógenos apresentam opções terapêuticas limitadas, piores desfechos clínicos, maiores taxas de mortalidade e são responsáveis por altos gastos financeiros dos sistemas de saúde (BASSETTI *et al.*, 2015).

5.4.1 TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

O TSA foi realizado para 220 dos 284 isolados de enterobactérias (77,5%). Alguns deles não foram analisados por uma falha de processamento (5, 8,5%) e outros (59, 26,8%) por uma limitação do sistema, que não realizou TSA para isolados de: *Pantoea spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter sedlakii* e para alguns isolados de *Leclercia adecarboxylata* e *Enterobacter amnigenus*. Para as análises de perfil de resistência aos antimicrobianos, foram consideradas as identificações realizadas pelo sistema Vitek2®.

Um único isolado de *K. pneumoniae* foi classificado como possível XDR. Esse isolado é proveniente de um paciente da CMI, que apresentou resistência a todas as classes de antimicrobianos testados, com exceção de aminoglicosídeos. Para fazer a confirmação dessa bactéria como XDR, era preciso que se testasse outras classes de antimicrobianos preconizados por Magiorakos e colaboradores, como: cefalosporinas anti-MRSA (ceftarolina), inibidores da síntese do folato (trimetoprima/sulfametoxazol), monobactâmicos (aztreonam), fenicóis (cloranfenicol), ácidos fosfônicos (fosfomicina) e tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina) (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

Dos 220 isolados para os quais obteve-se resultados de TSA, 77 (35%) foram classificados como MDR, ou seja não suscetível a 1 ou mais agentes pertencentes a ≥ 3 classes de antimicrobianos (Figura 12A). Incluindo isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae complex*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Kluyvera intermedia*, *Providencia stuartii* e *Yersinia enterocolitica group*.

Um total de 68 isolados (30,9%) foram resistentes às cefalosporinas de espectro estendido (ESC-R) (Figura 12B), incluindo isolados de *K. pneumoniae*, *E. cloacae complex*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* e *Raoultella ornithinolytica*.

A resistência aos carbapenêmicos em Gram-negativos é um fator que gera grande preocupação, pois, frequentemente, esses patógenos também são resistentes a outros agentes não- β -lactâmicos, sendo também considerados MDR ou XDR (LEE; DOI, 2014). Nesse trabalho, a resistência aos carbapenêmicos (CARB-R) foi observada para 32 isolados (14,5%) (Figura 12C) incluindo isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae complex*, *P. mirabilis* e *Raoultella ornithinolytica*.

As enterobactérias mais frequentes, que perfazem 73,2% dos isolados analisados e que apresentaram TSA são *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*. Essas três enterobactérias apresentaram proporções similares de isolados MDR (31,6%; 50,9% e 44,9%, respectivamente; $p = 0,1058$), porém, para resistência às ESCs e aos carbapenêmicos, os isolados de *E. coli* apresentaram proporções estatisticamente menores (ESCs = 15,8%; 56,4% e 46,9%; CARB = 1,8%; 27,3%; 26,5%; $p < 0,0005$).

Estudos de vigilância europeus relatam resistência às ESC de 11,9% em *E. coli* e de 25,6% em *K. pneumoniae* (BASSETTI *et al.*, 2015). No presente estudo, *E. coli* apresentou taxas similares (15,8%), porém, *K. pneumoniae* apresentou uma taxa mais elevada (46,9%).

A resistência aos carbapenêmicos é frequente em *K. pneumoniae* e considerada rara em *E. coli* e *Enterobacter spp.* Estudos relatam que a resistência aos carbapenêmicos em *E. coli* é menor que 0,1% na Europa e de até 3,5% nos EUA (BASSETTI *et al.*, 2015). Nesse estudo foi encontrada uma taxa de 1,8%.

K. pneumoniae apresenta taxas de resistência aos carbapenêmicos que variam de 0-60,5% na Europa e de até 12,8% nos EUA, no presente estudo foi observada uma taxa de 27,3% (BASSETTI *et al.*, 2015).

Apesar da resistência aos carbapenêmicos ser considerada mais rara em *Enterobacter spp.*, o presente estudo obteve taxas de resistência tão altas quanto em *K. pneumoniae* (26,5%).

Dos sete isolados de *Klebsiella oxytoca*, três foram classificados como MDR e como ESC-R, porém, nenhuma resistência aos carbapenêmicos foi detectada. *K. oxytoca* é considerado um patógeno oportunista, podendo causar pneumonia, bacteremia, infecções do trato urinário e enterocolite. Em 2015, no Japão, foi relatado um surto de *K. oxytoca* resistente às ESC (FUJITA *et al.*, 2015).

Dentre os sete isolados de *Proteus mirabilis*, um foi classificado como MDR e ESC-R e dois como CARB-R. Essa espécie é associada a infecções de trato urinário, de cavidade abdominal e corrente sanguínea. Podem possuir diversos determinantes de resistência, geralmente ESBL

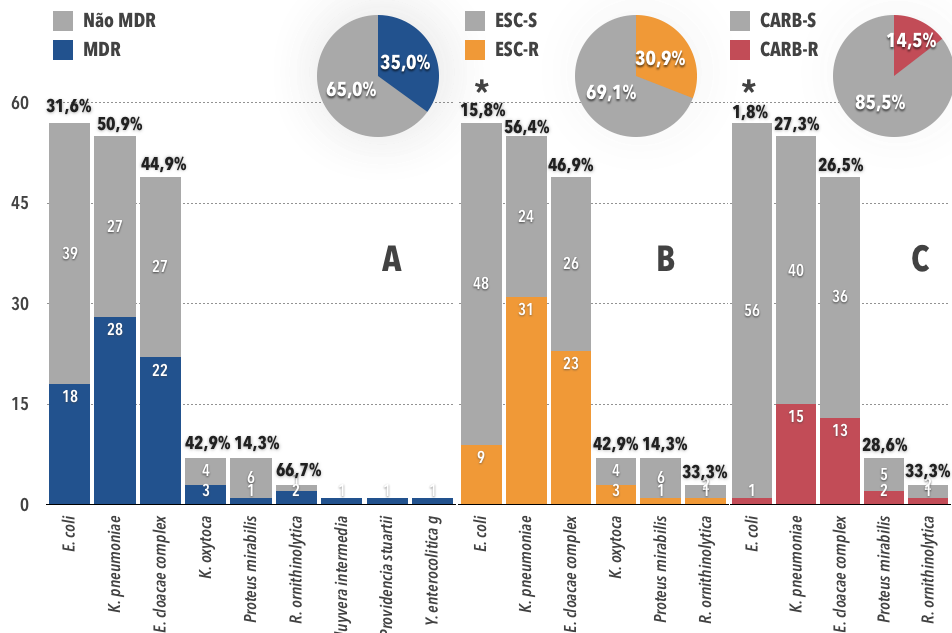
ou AmpC, mas raramente carbapenemases (TUMBARELLO *et al.*, 2012).

Dos três isolados de *Raoultella ornithinolytica*, dois foram MDR, um ESC-R e um CARB-R. Essa espécie é encontrada em ambientes aquáticos e hospitalares, sendo conhecida por raramente causar infecções em humanos, apesar de haver relatos de infecções de corrente sanguínea e de tecidos moles (KHAJURIA *et al.*, 2013).

Isolados MDR foram identificados para *Kluyvera intermedia*, *Providencia stuartii* e *Yersinia enterocolitica group*. Porém, nenhuma resistência às ESC ou aos carbapenêmicos foi identificada.

As demais enterobactérias não apresentaram perfil MDR, ESC-R ou CARB-R: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter sedlakii*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris*, *Kluyvera intermedia*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia liquefaciens group*, *Serratia odorifera* e *Serratia rubidaea*.

Figura 12: Perfil fenotípico de resistência das enterobactérias aos antimicrobianos.



A: Classificação em MDR (resistência multi-droga). B: ESC-R (resistência às cefalosporinas de espectro estendido). C: CARB-R (resistência aos carbapenêmicos). As porcentagens localizadas acima das barras representam a proporção de isolados positivos para as respectivas classificações de resistência. * $p < 0,05$ na comparação pareada com *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*.

Na tabela 7 estão descritos os perfis de resistência aos antimicrobianos para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*.

Os resultados do presente trabalho serão comparados com um estudo que analisou o perfil de resistência de 5.704 isolados bacterianos de pacientes de hospitais latino americanos, incluindo o Brasil, entre os anos de 2008 e 2010 (GALES, A. C. *et al.*, 2012).

Dentre os 57 isolados de *E. coli*, 31 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (54,4%). Dentre os 26 isolados que apresentam resistência a algum antimicrobiano, a maioria foi resistente à ampicilina (classe das penicilinas). A resistência às ESC só foi observada em *E. coli* proveniente de pacientes: 9,4% para ceftazidima, 17% para ceftriaxona e 5,7% para cefepima. Resultados similares aos encontrados por Gales e colaboradores, que foram: 9%, 23,9% e 12% respectivamente. Somente um isolado, proveniente de paciente, apresentou resistência a algum carbapenêmico (ertapenem – 1,9%) e nenhuma resistência a imipenem ou meropenem foi detectada. No estudo de Gales, também foram observadas taxas baixas de resistência aos carbapenêmicos - 0,1% para imipenem e meropenem (GALES, A. C. *et al.*, 2012).

Todos os isolados de *K. pneumoniae* (55) apresentaram resistência à ampicilina (resistência intrínseca). Um total de 56,4% das *K. pneumoniae* apresentaram resistência às ESC. Em pacientes, foram observadas proporções similares de resistência à cefepima (62,5%), ceftazidima (58,3%) e ceftriaxona (62,5%), taxas um pouco mais altas que aquelas encontradas no estudo de Gales e colaboradores: 36,3%, 40% e 52,5%, respectivamente. A resistência aos carbapenêmicos foi observada em 27,3% das *K. pneumoniae*, sendo as maiores proporções detectadas em isolados de pacientes: ertapenem (45,8%), imipenem (41,7%) e meropenem (41,7%), taxas que foram muito mais altas que aquelas encontradas entre os anos de 2008 e 2010 por Gales e colaboradores – 6,2% e 6,5% para imipenem e meropenem, respectivamente. Esses resultados reforçam o aumento da resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* nos últimos anos.

Dentre os antimicrobianos testados, a espécie *E. cloacae* apresenta resistência intrínseca à ampicilina, ampicilina/sulbactam e cefoxitina. Apesar de 100% dos isolados de *E. cloacae complex* provenientes de pacientes terem apresentado resistência a esses antimicrobianos, isso não foi observado para todos os isolados provenientes de profissionais ou ambiente. Uma das hipóteses para explicar esse resultado é que a resistência intrínseca nessas bactérias, assim como em outras enterobactérias que pertencem ao grupo CESP

(*Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*), é cromossomal e induzível por antimicrobianos (SANTOS *et al.*, 2015). Esse fator explicaria a sensibilidade em *Enterobacter spp.* proveniente de amostras de ambiente, que não estão sob pressão de antimicrobianos.

A resistência às ESC foi detectada em 46,9% das *E. cloacae complex*, sendo que uma maior proporção foi observada nos isolados provenientes de pacientes, com taxas de 65% para cefepima, ceftazidima e ceftriaxona. Esses resultados são maiores que os encontrados por Gales e colaboradores para *Enterobacter spp.*, que foram de 14%, 27,7% e 44,3%, respectivamente. A resistência aos carbapenêmicos foi detectada em 26,5% dos isolados, com proporções semelhantes entre pacientes e profissionais/ambiente. Em pacientes, as taxas foram de 40% para ertapenem e 25% para imipenem e meropenem. Essas taxas também foram bem mais elevadas que as encontradas entre os anos de 2008 e 2010 por Gales e colaboradores, de 1,3% para imipenem e 0,9% para meropenem, o que mostra o aumento da resistência aos carbapenêmicos também em *Enterobacter spp.*.

Para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*, a resistência à polimixina foi baixa e encontrada somente em pacientes. Apesar de não ser o foco deste trabalho, esse resultado mostra que as polimixinas parecem ser uma classe ainda eficiente para tratamento de infecções causadas pelas enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

Tabela 7: Perfil de resistência das principais enterobactérias aos antimicrobianos: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*. Quantidade de isolados resistentes a cada antimicrobiano e a sua distribuição em pacientes e profissionais da saúde/ambiente hospitalar.

| CLASSE | ANTIMICROBIANO | <i>E. coli</i> | | <i>K. pneumoniae</i> | | <i>E. cloacae complex</i> | |
|--|--------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | PCT (N = 53) | PRF + AMB (N = 4) | PCT (N = 24) | PRF + AMB (N = 31) | PCT (N = 20) | PRF + AMB (N = 29) |
| | | R (%) | R (%) | R (%) | R (%) | R (%) | R (%) |
| Aminoglicosídeos | Amicacina | 0 (0.0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| | Gentamicina | 7 (13.2%) | 0 (0%) | 5 (20.8%) | 8 (25.8%) | 10 (50.0%) | 8 (27.6%) |
| Penicilinas | Ampicilina | 22 (41.5%) | 1 (25%) | 24 (100%)* | 31 (100%)* | 20 (100%)* | 25 (86.2%)* |
| Penicilinas + Inibidores de β-lactamase | Ampicilina/ Sulbactam | 6 (11.3%) | 0 (0%) | 16 (66.7%) | 12 (38.7%) | 20 (100%)* | 25 (86.2%)* |
| Cefamicinas | Cefoxitina | 1 (1.9%) | 0 (0%) | 13 (54.2%) | 5 (16.1%) | 20 (100%)* | 28 (96.6%)* |
| Cefalosporinas de Espectro Estendido (ESC - 3 ^a e 4 ^a geração) | Cefepima | 3 (5.7%) | 0 (0%) | 15 (62.5%) | 10 (32.3%) | 13 (65.0%) | 9 (31.0%) |
| | Ceftazidima | 5 (9.4%) | 0 (0%) | 14 (58.3%) | 10 (32.3%) | 13 (65.0%) | 10 (34.5%) |
| | Ceftriaxona | 9 (17.0%) | 0 (0%) | 15 (62.5%) | 16 (51.6%) | 13 (65.0%) | 9 (31.0%) |
| Cefalosporinas de | Cefuroxima | 8 | 0 | 16 | 16 | 17 | 12 |

| | | | | | | | |
|---|-----------------------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Espectro Não-estendido (1a e 2a geração) | | (15.1%) | (0%) | (66.7%) | (51.6%) | (85.0%) | (41.4%) |
| | Axetil Cefuroxima | 8 (15.1%) | 0 (0%) | 16 (66.7%) | 16 (51.6%) | 20 (100%) | 26 (89.7%) |
| Fluoroquinolonas | Ciprofloxacina | 14 (26.4%) | 1 (25%) | 14 (58.3%) | 5 (16.1%) | 12 (60.0%) | 8 (27.6%) |
| Polimixinas | Colistina | 1 (1.9%) | 0 (0%) | 1 (4.2%) | 0 (0%) | 2 (10.0%) | 0 (0.0%) |
| Carbapenêmicos | Ertapenem | 1 (1.9%) | 0 (0%) | 11 (45.8%) | 4 (12.9%) | 8 (40.0%) | 5 (17.2%) |
| | Imipenem | 0 (0.0%) | 0 (0%) | 10 (41.7%) | 3 (9.7%) | 5 (25.0%) | 3 (10.3%) |
| | Meropenem | 0 (0.0%) | 0 (0%) | 10 (41.7%) | 3 (9.7%) | 5 (25.0%) | 2 (6.9%) |
| Penicilinas Anti- pseudomonas + Inibidores de β-lactamase | Piperacilina/ Tazobactam | 5 (9.4%) | 0 (0%) | 14 (58.3%) | 7 (22.6%) | 12 (60.0%) | 8 (27.6%) |
| Glicilciclinas | Tigeciclina | 0 (0.0%) | 0 (0%) | 12 (50.0%) | 7 (22.6%) | 12 (60.0%) | 10 (34.5%) |

PCT: Pacientes

PRF + AMB: Profissionais de saúde e Ambiente hospitalar

* Resistência intrínseca

5.4.2 Detecção de genes codificadores de β -lactamases

A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas de importância clínica (CURCIO, 2014).

Dos 284 isolados analisados para a presença de genes de resistência, 90 foram positivos para um ou mais genes (31,7%). Dos 90 isolados, 89 (98,9%) foram positivos para algum gene do tipo *bla*_{CTX-M} (ESBL) ou *bla*_{SHV} (penicilinase/ESBL) e 13 (14,4%) foram positivos para *bla*_{KPC} (único codificador de carbapenemase identificado). Com exceção de um, todos os isolados positivos para *bla*_{KPC} também apresentaram outros genes de resistência, uma média de 2,92 genes por isolado.

A frequência dos genes de resistência está descrita na figura 13.

Em um estudo de revisão sobre a resistência de enterobactérias no Brasil, verificou-se que a enzima CTX-M-2 é a ESBL mais prevalente, além de ser a encontrada no maior número de espécies (SAMPAIO; GALES, 2016). Em um estudo realizado no HU-UFSC com enterobactérias resistentes às ESC, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi o segundo gene do tipo CTX-M mais frequente (17,5% - 7/40) (ZAMPARETTE, 2014). Porém, no presente estudo, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi positivo para um único isolado de *E. coli*, obtendo-se uma frequência de 0,4% (1/284) e sendo considerado o CTX-M menos frequente nas amostras analisadas (desconsiderando o *bla*_{CTX-M-25}, que não foi detectado nesses isolados).

O gene mais frequente nesse estudo foi o *bla*_{SHV}, detectado em 20,1% (57/284) dos isolados, a maioria deles de *K. pneumoniae*. Um estudo encontrou uma frequência similar, de 24,2%, em isolados de pacientes de um hospital terciário brasileiro (NOGUEIRA *et al.*, 2015). No estudo de Zamparette, *bla*_{SHV} foi encontrado em 60% das enterobactérias resistentes às ESC do HU-UFSC (24/40), sendo menos frequente somente em relação ao *bla*_{TEM}, que não foi pesquisado no presente estudo (ZAMPARETTE, 2014).

Depois do *bla*_{SHV}, os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-8} foram os mais frequentes, presentes em 10,2% (29/284) e 8,7% (25/284) dos isolados, respectivamente.

O gene *bla*_{CTX-M-1} foi mais encontrado em isolados de *K. pneumoniae* (44,8% - 13/29) e *E. cloacae complex* (34,5% - 10/29). No Brasil, enzimas do grupo CTX-M-1 haviam sido reportadas para *K. pneumoniae* (tipos 1, 15 e 28), *E. coli* (tipo 3), *Enterobacter spp.* (tipo 15) e *K. oxytoca* (tipo 28) (SAMPAIO; GALES, 2016). No presente estudo, esse gene foi detectado em todas essas enterobactérias e também em *Pantoea spp.* No estudo de Zamparette, o tipo 1 também foi o gene

de *bla*_{CTX-M} mais frequente em isolados de enterobactérias resistentes às ESC provenientes de pacientes do HU-UFSC, com frequência de 42,5% (ZAMPARETTE, 2014).

O gene *bla*_{CTX-M-8} foi mais encontrado em *K. pneumoniae* (44,0% - 11/25). No Brasil, a enzima CTX-M-8 já havia sido reportada em *Citrobacter amalonaticus*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além dessas, esse estudo encontrou o gene *bla*_{CTX-M-8} em *Pantoea spp.*, *Raoultella ornithinolytica* e *K. oxytoca* (SAMPAIO; GALES, 2016).

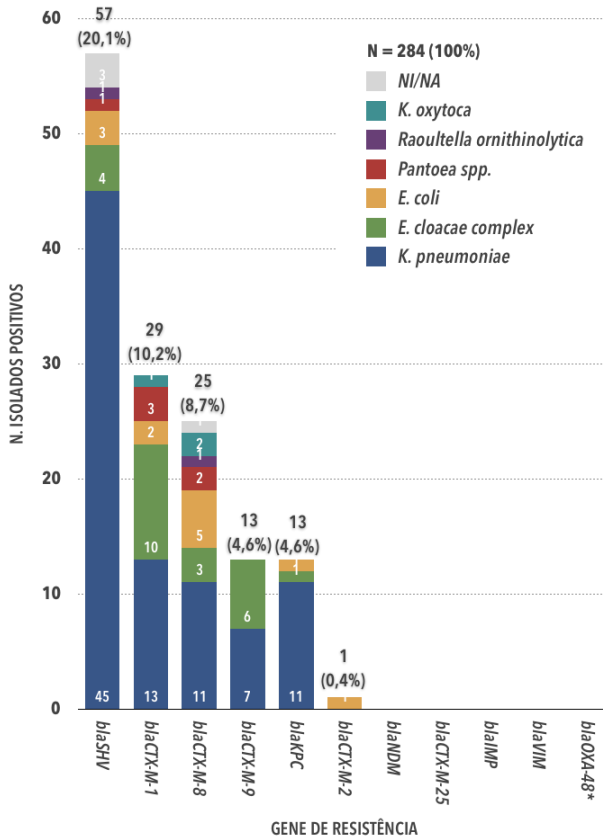
Em seguida estão os genes *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{KPC}, ambos com frequência de 4,6% (13/284).

O *bla*_{CTX-M-9} só foi detectado em *K. pneumoniae* (53,8% - 7/13) e *E. cloacae complex* (46,2% - 6/13), apesar de outros estudos brasileiros já terem reportado a presença de enzimas do grupo CTX-M-9 em *Citrobacter freundii* e *E. coli* (SAMPAIO; GALES, 2016). No estudo de Zamparette realizado no HU-UFSC com isolados de enterobactérias resistentes às ESC, a frequência do *bla*_{CTX-M-9} foi de 12,5% (5/40) (ZAMPARETTE, 2014).

O *bla*_{KPC} foi o único codificador de carbapenemase identificado dentre os genes analisados. A maioria deles foram detectados em *K. pneumoniae* (84,6% - 11/13). As carbapenemases são as β -lactamases com o espectro de atividade mais amplo. Além dos carbapenêmicos, essas enzimas hidrolisam a maioria dos β -lactâmicos, com poucas exceções. As enzimas KPC são as mais prevalentes e mais distribuídas globalmente (LEE; DOI, 2014). No Brasil, essa enzima é considerada endêmica e predominante, assim como em partes dos Estados Unidos, Colômbia, Argentina e nos países mediterrâneos – Itália, Grécia e Israel (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015). Segundo dados de vigilância do próprio HU-UFSC, 76 pacientes foram infectados por bactérias produtoras de KPC nesse mesmo período (abril-setembro 2015), o que representou 28,5% dos casos de infecções e colonizações desse período.

Genes para CTX-M-25 e para as demais carbapenemases, NDM, IMP, VIM e OXA-48 não foram detectados, apesar de já terem sido reportados casos no Brasil (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; FARIA-JUNIOR *et al.*, 2016; LINCOPAN, 2006; PENTEADO *et al.*, 2009; PEREIRA; BORGHI; ASENSI, 2014; QUILLES *et al.*, 2015; ROZALES *et al.*, 2014; SAMPAIO; GALES, 2016; SILVA *et al.*, 2015)

Figura 13: Frequência observada dos diferentes genes de resistência a antimicrobianos testados em *Enterobacteriaceae* (N = 284).



As porcentagens localizadas acima das barras representam a proporção de isolados positivos para cada gene de resistência em relação ao número total de isolados analisados (N = 284). NI/NA = Não identificado/Não analisado;

* Gene só testado para *K. pneumoniae* (N = 124).

Dentre as enterobactérias mais frequentes, a que apresentou maior proporção de isolados positivos para algum gene de resistência foi *Klebsiella pneumoniae* (85,5% - 47/55) ($p < 0,05$). Uma média de 1,85 gene por isolado, sendo o gene *bla*_{SHV} o mais frequentemente identificado nessa espécie (81,8% - 45/55), seguido de *bla*_{CTX-M-1} (23,6% - 13/55), *bla*_{CTX-M-8} (20% - 11/55), *bla*_{KPC} (20% - 11/55) e *bla*_{CTX-M-9} (12,7% - 7/55). Na figura 14 pode-se observar as combinações dos diferentes genes de resistência detectados por isolado de *K. pneumoniae*,

algumas combinações foram: $bla_{SHV} + bla_{CTX-M-8}$ (n = 7); $bla_{SHV} + bla_{CTX-M-1} + bla_{CTX-M-8}$ (n = 6); $bla_{SHV} + bla_{KPC} + bla_{CTX-M-9}$ (n = 5) e $bla_{SHV} + bla_{KPC} + bla_{CTX-M-1}$ (n = 3).

Das enterobactérias mais frequentes, *Enterobacter cloacae complex* teve a segunda com maior proporção de isolados positivos para algum gene de resistência (42,9% - 21/49). Uma média de 1,14 gene por isolado foi observada, sendo $bla_{CTX-M-1}$ o mais frequente (20,4% - 10/49), seguido de $bla_{CTX-M-9}$ (12,2% - 6/49), bla_{SHV} (8,2% - 4/49), $bla_{CTX-M-8}$ (6,1% - 3/49) e bla_{KPC} (2% - 1/49). Na figura 15 estão representadas as combinações de genes identificadas para *E. cloacae complex*, as únicas combinações encontradas foram: $bla_{SHV} + bla_{CTX-M-1} + bla_{CTX-M-8}$ (n = 1) e $bla_{SHV} + bla_{CTX-M-1}$ (n = 1).

Dos 57 isolados de *Escherichia coli*, somente 19,3% (11/57) foram positivos para algum gene de resistência, com uma média de 1,09 gene por isolado. O gene mais frequente foi $bla_{CTX-M-8}$ (8,8% - 5/57), seguido de bla_{SHV} (5,3% - 3/57), $bla_{CTX-M-1}$ (3,5% - 2/57), bla_{KPC} (1,8% - 1/57) e $bla_{CTX-M-2}$ (2,8% - 1/57). A única combinação encontrada foi de $bla_{CTX-M-1} + bla_{KPC}$ (n = 1) (Figura 16).

Dentre as enterobactérias mais frequentes, *Pantoea spp.* foi a que apresentou a menor proporção de isolados positivos para algum gene de resistência (5,6% - 3/54). Os genes identificados foram: $bla_{CTX-M-1}$ (5,6% - 3/54), $bla_{CTX-M-8}$ (3,7% - 2/54) e bla_{SHV} (1,9% - 1/54). Foram encontradas combinações de $bla_{CTX-M-1} + bla_{CTX-M-8} + bla_{SHV}$ (n = 1) e $bla_{CTX-M-1} + bla_{CTX-M-8}$ (n = 1).

As demais enterobactérias que apresentaram isolados positivos para algum gene de resistência foram: *Klebsiella oxytoca* (42,9% - 3/7), com isolados positivos para $bla_{CTX-M-8}$ (n = 2) e $bla_{CTX-M-1}$ (n = 1); e *Raoultella ornithinolytica* (66,7% - 2/3), com um isolado positivo para $bla_{CTX-M-8}$ e um para bla_{SHV} .

No estudo de Zamparette com enterobactérias isoladas de pacientes resistentes às ESC do HU-UFSC, também foram encontradas associações de mais de um gene de resistência na mesma cepa. O gene bla_{SHV} foi somente detectado juntamente com bla_{TEM} e/ou bla_{CTX-M} (ZAMPARETTE, 2014).

Figura 14: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em *Klebsiella pneumoniae*. Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência.

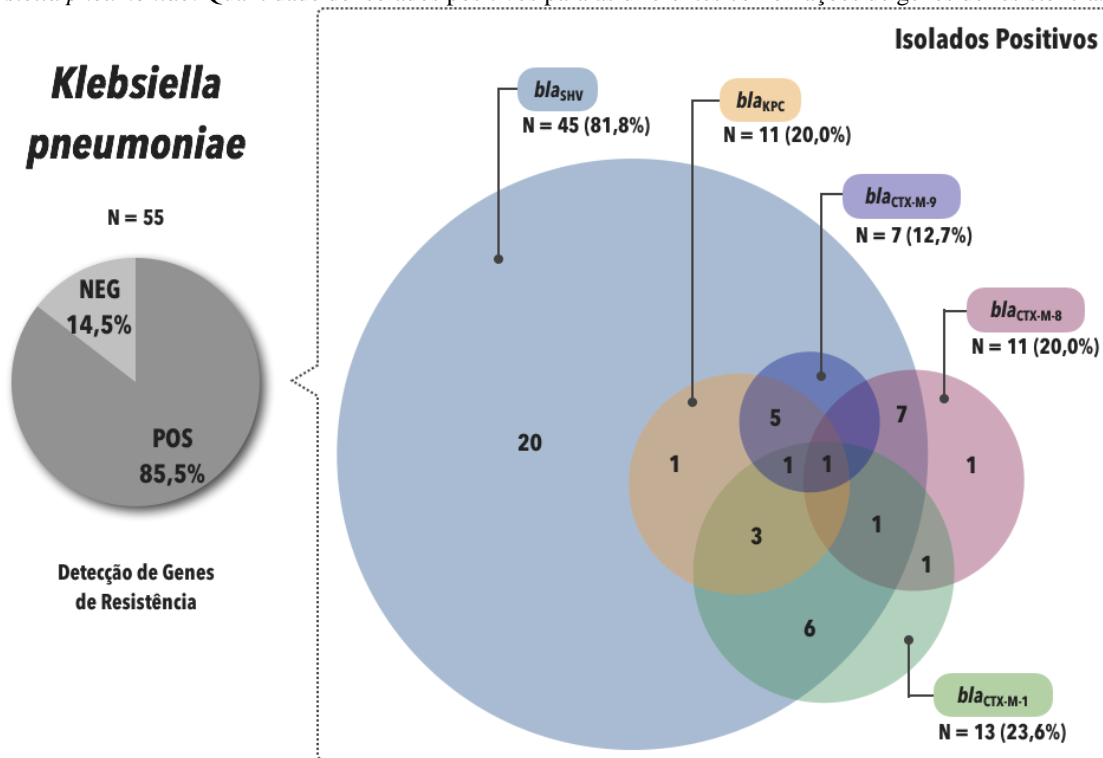


Figura 15: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em *E. cloacae complex*. Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência.

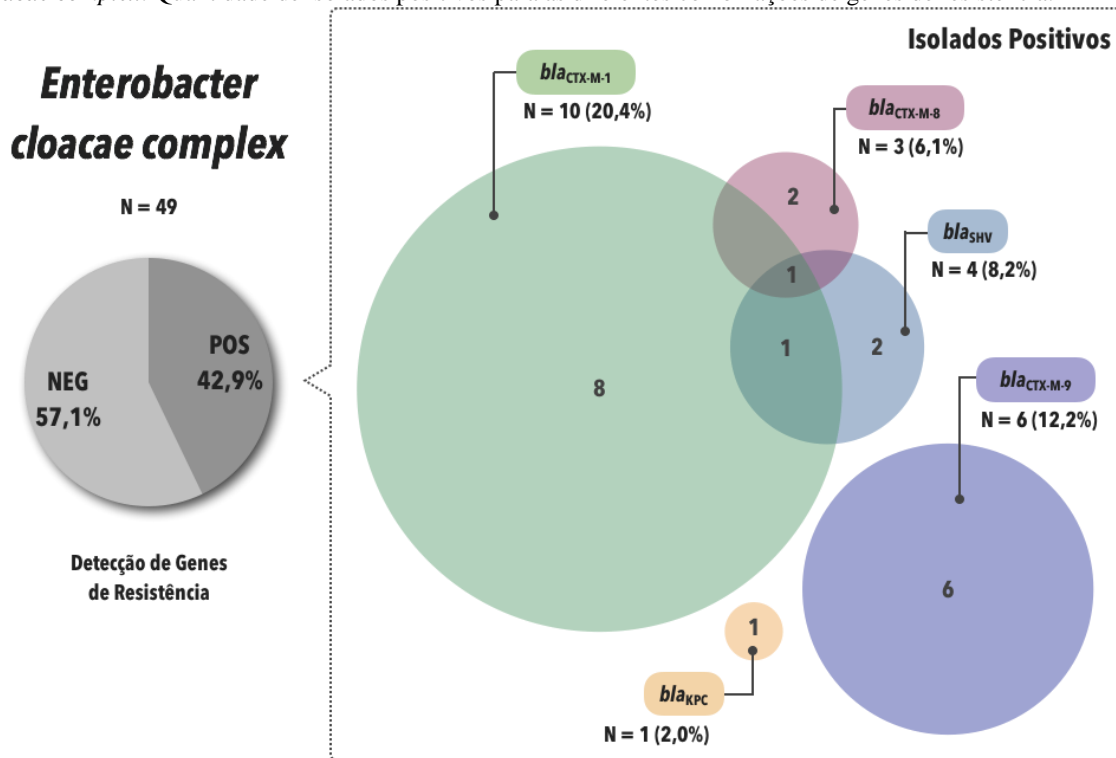
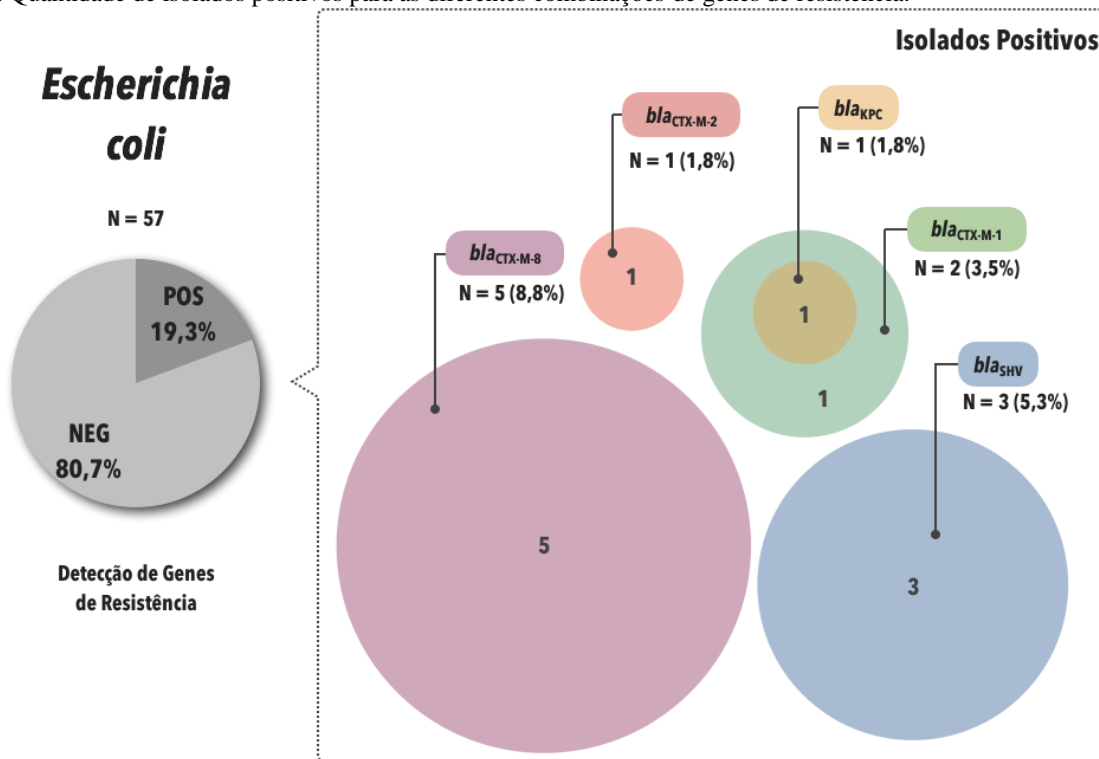


Figura 16: Proporção de isolados positivos (POS) ou negativos (NEG) para algum dos genes de resistência pesquisados em *E. coli*. Quantidade de isolados positivos para as diferentes combinações de genes de resistência.



5.4.3 Comparação entre Perfil Fenotípico e Genotípico de Resistência

De acordo com o TSA, 68 isolados de enterobactérias apresentaram resistência às cefalosporinas de espectro estendido (ESC-R), desses, 58 (85,3%) possuíam algum gene de resistência codificador de ESBL (dos grupos *bla*_{CT-X-M} ou *bla*_{SHV}), porém, 10 (14,7%) não foram positivos para nenhum dos genes ESBL testados (Figura 17A). Isso aconteceu para um isolado de *E. coli*, um de *K. pneumoniae*, seis de *E. cloacae complex*, dois de *K. oxytoca* e um de *Proteus mirabilis*. Estudos europeus relatam que 70,5-100% das *E. coli* e 62-100% das *K. pneumoniae* resistentes às ESC são produtoras de ESBL (BASSETTI *et al.*, 2015). Portanto, nesses casos, pode ser que haja outro gene codificador de ESBL ou mecanismo que não foi pesquisado.

O contrário também foi observado. Dos 152 isolados sensíveis às ESC, seis apresentaram algum gene do grupo *bla*_{CT-X-M} (em conjunto ou não com *bla*_{SHV}), isso aconteceu para três isolados de *E. coli*, dois de *E. cloacae complex* e um de *K. oxytoca*. Algumas hipóteses que podem explicar esses resultados são: (1) não expressão desses genes; ou (2) mais de uma espécie estava presente na amostra de DNA, devido ao não isolamento completo da cepa, por exemplo.

Além desses, 17 isolados de *K. pneumoniae* e um de *E. cloacae complex* sensíveis às ESC foram positivos somente para *bla*_{SHV}, o que indica a possibilidade desse gene codificar para a enzima SHV do tipo 1, que não confere resistência às ESC.

A resistência aos carbapenêmicos foi identificada em 32 isolados de enterobactérias, desses, 12 (37,5%) foram positivos para *bla*_{KPC} e 20 (62,5%) não apresentaram nenhum dos genes de carbapenemase testados (Figura 17B). Isso foi observado para quatro isolados de *K. pneumoniae*, para todos os isolados de *E. cloacae complex* resistentes a carbapenêmicos (N = 13), dois de *Proteus mirabilis* e um de *Raoultella ornithinolytica*. Esse resultado indica que outros genes ou mecanismos podem ser responsáveis por conferir resistência aos carbapenêmicos.

Em *K. pneumoniae*, apesar de KPC ser a enzima mais frequente, outras carbapenemases podem conferir resistência aos carbapenêmicos, como a BKC-1 (*Brazilian Klebsiella Carbapenemase*), que foi descrita recentemente no Brasil (VASCONCELOS; OLIVEIRA; GALES, 2015).

A resistência aos carbapenêmicos não ocorre necessariamente pela produção de carbapenemases. Isolados que produzem alguma ESBL ou AmpC, quando em conjunto com a perda de porinas, assim como a superexpressão de bombas de efluxo, podem apresentar perfil de resistência aos carbapenêmicos (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

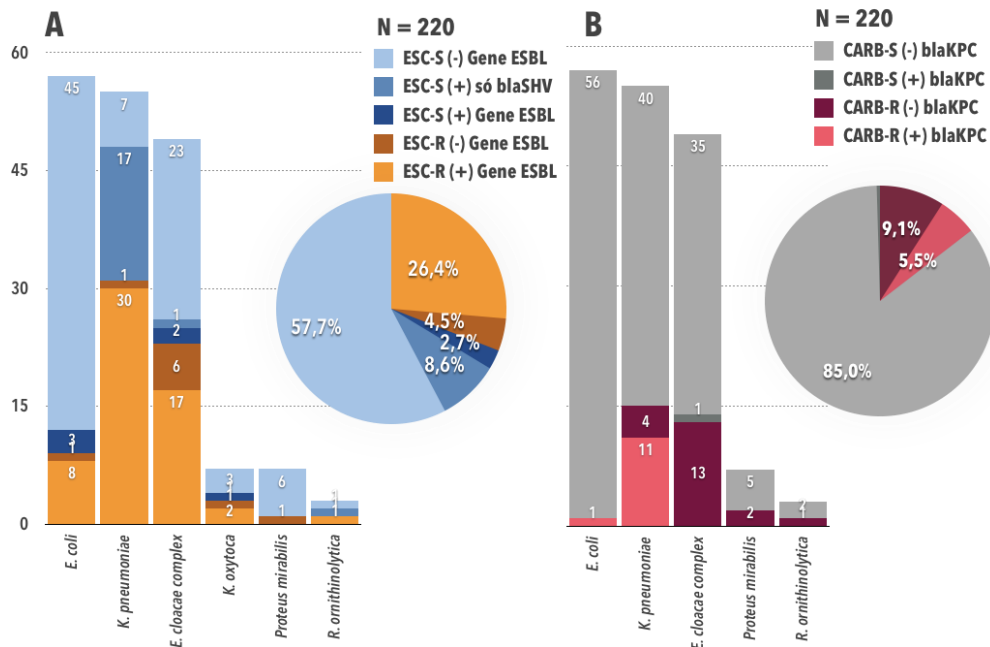
Em um estudo realizado no Chile em 2012, a resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacter spp.* foi associada tanto com a atividade de AmpC quanto de ESBL (WOZNIAK *et al.*, 2012). No presente estudo, das 13 *E. cloacae complex* com resistência aos carbapenêmicos, 12 apresentavam um gene codificador de ESBL. Sugere-se que esses outros fatores sejam analisados para que se confirme o mecanismo de resistência dessas bactérias.

Em *P. mirabilis*, a resistência aos carbapenêmicos pode ser mediada pelas enzimas KPC, OXA-23 ou por mutação nos genes de porinas, com ou sem o aumento da expressão de PBPs (BONNET, R *et al.*, 2006; TIBBETTS *et al.*, 2008; VILLAR; DANIEL; LIVERMORE, 1997).

Em *R. ornithinolytica*, há relatos de resistência aos carbapenêmicos pela produção de enzimas KPC-2 e NDM-1 (CASTANHEIRA *et al.*, 2009; KHAJURIA *et al.*, 2013), porém, no presente estudo, os genes codificadores de ambas as enzimas estavam ausentes.

Dos isolados sensíveis a carbapenêmicos, somente um isolado de *E. cloacae complex* proveniente de equipamento de leito apresentou o gene *bla*_{KPC}. Porém, essa amostra apresentou um Cq de 31, considerado alto em comparação com as demais amostras positivas para esse gene. Nesse caso, uma possível hipótese é que a amostra de DNA analisada apresentasse sequências de mais de uma espécie, sugere-se que esse ensaio seja repetido.

Figura 17: Comparação do perfil fenotípico e genotípico de resistência antimicrobiana das enterobactérias.



A: Resistência e sensibilidade às cefalosporinas de espectro estendido (ESC-R/S), isolados com e sem genes de resistência codificador de ESBL. B: Resistência e sensibilidade a carbapenêmicos (CARB-R/S), isolados com e sem gene *bla*_{KPC}. As porcentagens representam as proporções em relação ao número total (N) de amostras analisadas.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES

As enterobactérias foram classificadas de diferentes formas com base nos seus perfis fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos: em MDR (isolado não suscetível a 1 ou mais agentes pertencentes a ≥ 3 classes de antimicrobianos); ESC-R (resistência a cefalosporinas de espectro estendido); CARB-R (resistência aos carbapenêmicos); positivas para os genes *bla*_{SHV} (penicilinase/ESBL), *bla*_{CTX-M} (ESBL) e *bla*_{KPC} (carbapenemase).

5.5.1 Distribuição das Enterobactérias Resistentes por Fonte de Coleta

Para todas as classificações de resistência, não houve diferença significativa nas proporções encontradas em pacientes (PCT), profissionais de saúde (PRF) e ambiente hospitalar (AMB) ($p > 0,05$) (Figuras 18-23). Esse resultado demonstra que as enterobactérias resistentes não estão presentes somente nos pacientes, o que reforça o papel do ambiente e dos profissionais como repositórios importantes desses micro-organismos.

Em pacientes, a proporção de enterobactérias MDR foi de 40,7% (50/123), 31,7% (39/123) foram ESC-R, 21,1% (27/128) são positivas para *bla*_{SHV} e 25% (32/128) para algum gene do grupo *bla*_{CTX-M}. 17,9% (22/123) são CARB-R e 7% (9/128) possuem o gene *bla*_{KPC}.

Em pacientes, um resultado que se destaca é que, apesar das mãos não terem apresentado um grande número de isolados de enterobactérias em comparação com os *swabs* nasais e retais, uma alta proporção de resistência foi observada nesse sítio de coleta. Além disso, dos 10 pacientes que apresentaram mãos positivas para enterobactérias, seis foram positivos para uma bactéria com o mesmo perfil no *swab* retal ou nasal, esse resultado aponta para a importância da higienização das mãos dos pacientes, que pode servir como vetor de bactérias resistentes.

As proporções de resistência nos isolados de *swabs* retais e nasais foram similares. Apesar dos *swabs* retais terem sido o sítio de coleta com maior proporção de amostras positivas e com o maior número de isolados, muitas dessas enterobactérias não apresentavam perfil de resistência aos antimicrobianos. A maioria das espécies encontradas nesse sítio foi *E. coli* (52,6% - 50/95), entretanto, somente 15 delas (30%) são MDR, sete (14%) são ESC-R, duas (4%) positivas para *bla*_{SHV}, 6 (12%) com *bla*_{CTX-M} e uma (2%) é CARB-R e possui o gene *bla*_{KPC}.

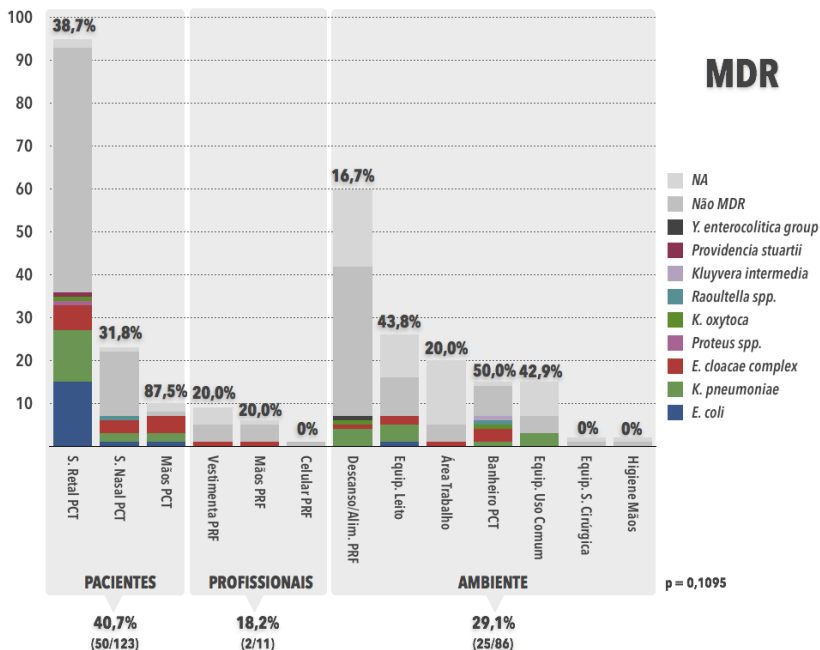
Nos profissionais, a proporção de MDR foi de 18,2% (2/11), 36,4% (4/11) de ESC-R, 12,5% (2/16) positivas para *bla*_{SHV}, 6,3%

(1/16) para algum gene do grupo *bla*_{CTX-M}, 18,2% (2/11) são CARB-R e nenhum isolado apresentou o gene *bla*_{KPC}. O único isolado proveniente dos celulares dos profissionais foi uma *E. cloacae complex* que não apresentou perfil de resistência nas classificações adotadas. Os isolados das mãos e das vestimentas dos profissionais apresentaram perfil semelhante, ambos os sítios apresentaram um isolado de *E. cloacae complex* com resistência aos carbapenêmicos, porém, sem o gene *bla*_{KPC}.

Dos isolados de ambiente hospitalar, 29,1% (25/86) foram classificados como MDR, 29,1% (25/86) como ESC-R, 20% (28/140) positivas para *bla*_{SHV} e 19,3% para *bla*_{CTX-M}. Somente 9,3% (8/86) foram classificados como CARB-R e 2,9% (4/140) positivos para *bla*_{KPC}, gene que só foi encontrado em três isolados de equipamento de leito (grades de leito e parede de gases/suporte de soro) e um de equipamento de uso comum (carrinho de banho).

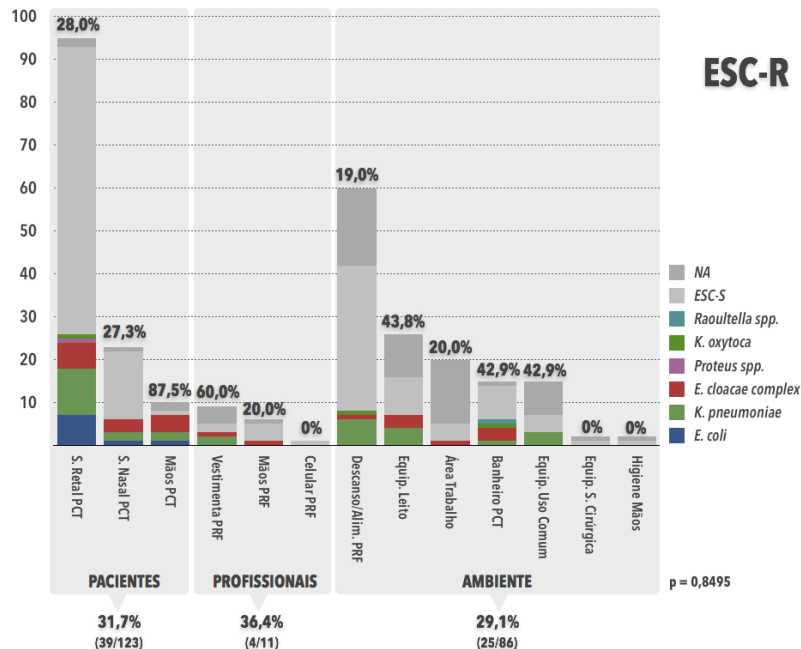
Apesar das áreas de descanso e alimentação dos profissionais terem apresentado as maiores proporções de amostras positivas e quantidade de isolados, a maioria das enterobactérias encontradas nesses locais não apresentavam perfil de resistência aos antimicrobianos. Nenhuma apresentou resistência aos carbapenêmicos ou o gene *bla*_{KPC}. As três espécies mais encontradas nessas áreas foram: *Pantoea spp.* (que não foram analisadas no TSA), *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex*. Das 15 *K. pneumoniae*, somente quatro são MDR (26,7%), seis (40%) são ESC-R, sete (46,7%) positivas para *bla*_{SHV} e quatro (26,7%) positivas para *bla*_{CTX-M}. E das 12 *E. cloacae complex*, somente uma é MDR, ESC-R e positiva para *bla*_{SHV} e duas para *bla*_{CTX-M}.

Figura 18: Distribuição e proporções de enterobactérias MDR nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



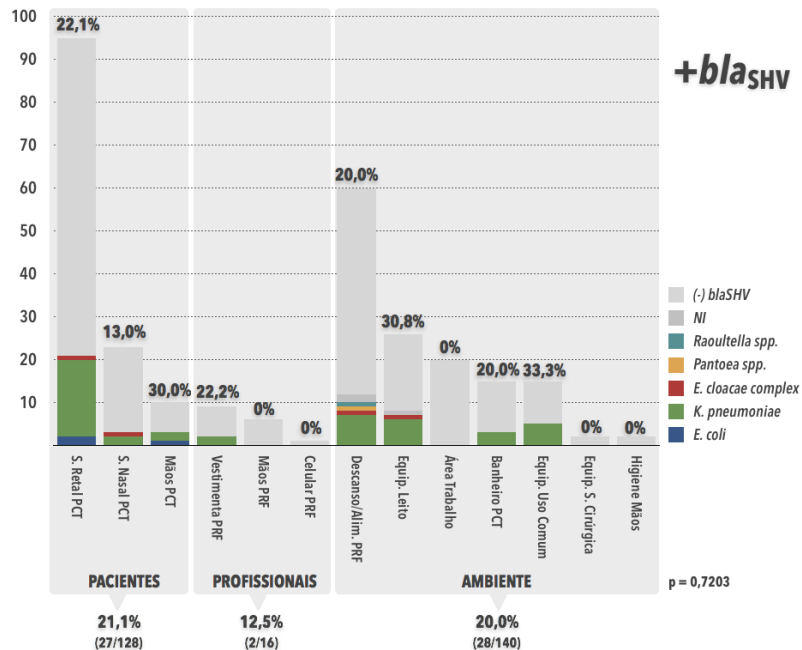
NA: não analisado (não considerado no cálculo de proporção). P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. As porcentagens representam as proporções de isolados MDR em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

Figura 19: Distribuição e proporções de enterobactérias ESC-R (resistentes às cefalosporinas de espectro estendido) nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



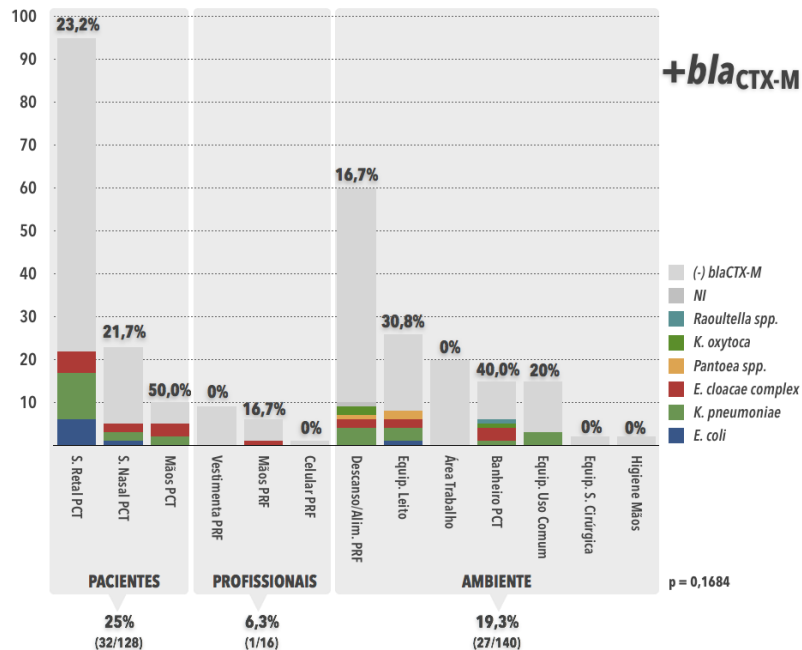
NA: não analisado (não considerado no cálculo de proporção). P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. As porcentagens representam as proporções de isolados ESC-R em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

Figura 20: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para o gene bla_{SHV} nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



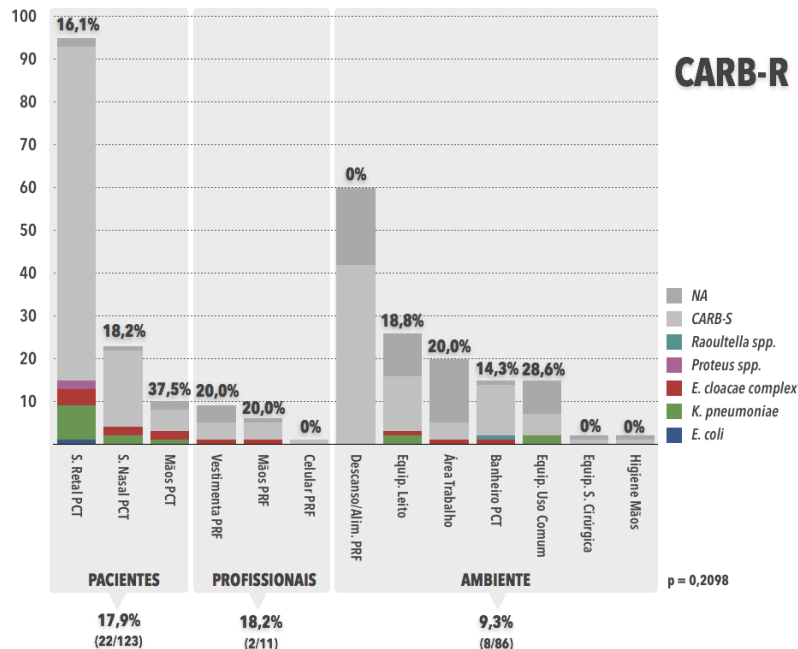
NI: não identificado. P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. As porcentagens representam as proporções de isolados positivos para bla_{SHV} em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

Figura 21: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para algum gene bla_{CTX-M} nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



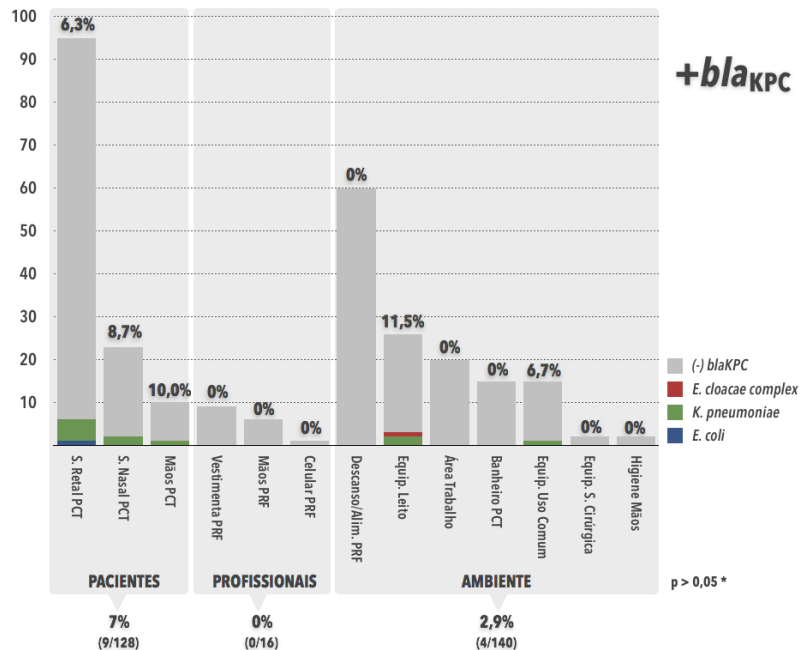
NI: não identificado. P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. As porcentagens representam as proporções de isolados positivos para bla_{CTX-M} em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

Figura 22: Distribuição e proporções de enterobactérias CARB-R (resistentes a carbapenêmicos) nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



NA: não analisado (não considerado no cálculo de proporção). P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. As porcentagens representam as proporções de isolados CARB-R em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

Figura 23: Distribuição e proporções de enterobactérias positivas para o gene *bla_{KPC}* nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais e ambiente hospitalar.



NI: não identificado. P = Teste de qui-quadrado para comparação entre as fontes de coleta. * Teste Exato de Fisher. As porcentagens representam as proporções de isolados positivos para *bla_{KPC}* em relação ao número total de isolados do respectivo sítio de coleta.

5.5.2 Distribuição das Enterobactérias Resistentes por Unidade Hospitalar

Na tabela 8 está descrita a distribuição das enterobactérias resistentes por unidade hospitalar. Dos 21 isolados do CC, nenhum apresentou perfil de resistência, somente três isolados foram positivos para o gene *bla*_{SHV} (provável *bla*_{SHV-1}), que foram detectados em *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex* isoladas da copa.

Não houve diferença significativa na proporção de isolados MDR, ESC-R ou CARB-R entre as outras quatro unidades hospitalares. Entretanto, as proporções de MDR foram maiores na UTI, as de ESC-R e CARB-R foram maiores na UTI e CMI. Esse era um resultado esperado pelo fato da UTI ser considerada uma unidade com alto risco para aquisição de micro-organismos resistentes (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015). Além disso, a CMI é uma unidade considerada de isolamento para pacientes resistentes, o que explica a maior resistência também nessa unidade.

Quanto à presença de genes de resistência, a EMG apresentou as menores proporções de isolados positivos para *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} ($p < 0,05$).

O gene *bla*_{KPC} apresentou maior frequência na CMI (12,5% - 6/48), seguido da UTI (5,6% - 5/89) e EMG (2,7% - 2/74). A CRI e o CC não tiveram isolados positivos para esse gene. A presença do gene *bla*_{KPC} na CMI e UTI era um resultado esperado, por serem unidades com mais pacientes infectados por bactérias resistentes.

Tabela 8: Perfil fenotípico e genotípico de resistência das enterobactérias aos antimicrobianos e sua distribuição por unidade hospitalar.

| Unidade Hospitalar | Isolados (N = 284) | MDR | ESC-R | CARB-R | (+)bla_{SHV} | (+)bla_{CTX-M} | (+)bla_{KPC} |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| UTI | 89 | 32 (41,5%) | 29 (42,0%) | 16 (23,2%) | 23 (25,8%) | 28 (31,5%) | 5 (5,6%) |
| EMG | 74 | 15 (19,5%) | 13 (23,6%) | 5 (9,1%) | 5 (6,8%) | 9 (12,2%) | 2 (2,7%) |
| CRI | 52 | 17 (22,1%) | 10 (23,3%) | 3 (7,0%) | 10 (19,2%) | 14 (26,9%) | 0 (0%) |
| CMI | 48 | 13 (16,9%) | 16 (37,2%) | 8 (18,6%) | 16 (33,3%) | 9 (18,8%) | 6 (12,5%) |
| CC | 21 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (14,3%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| TOTAL | 284 | 77 (35,0%) | 68 (30,9%) | 32 (14,5%) | 57 (20,1%) | 60 (21,1%) | 13 (4,6%) |

MDR (isolado não suscetível a 1 ou mais agentes pertencentes a ≥ 3 classes de antimicrobianos);

ESC-R (resistência a cefalosporinas de espectro estendido);

CARB-R (resistência aos carbapenêmicos).

5.6 CORRELAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

Dos 66 pacientes que participaram do estudo, 61 apresentaram culturas positivas para pelo menos uma enterobactéria, sendo 35 (53%) deles positivos para enterobactérias MDR, 28 (42,4%) para ESC-R e 16 (24,2%) para CARB-R.

Na tabela 9 estão descritos alguns dados clínicos correlacionados com a presença de enterobactérias resistentes.

A média do tempo de internação dos pacientes foi de 15 dias, variando de 1 a 76. Médias de 21 e 25 dias foram observadas para pacientes com enterobactérias resistentes. As unidades hospitalares que apresentaram maior média de tempo de internação foram CRI e CMI, com 24,7 e 22,8 dias, respectivamente.

A idade média dos pacientes foi de 61,8 anos, variando de 16 a 106. Os pacientes com bactérias resistentes apresentaram médias similares, entre 55 e 59 anos.

Segundo os dados obtidos dos questionários e prontuários médicos, 30 pacientes (45,5%) apresentavam infecção, 3 (4,5%) estavam sabidamente colonizados e 32 (48,5%) não apresentavam infecção ou colonização (para um paciente esse dado não estava disponível). Dos 30 pacientes com infecção, 20 (66,7%) apresentavam enterobactérias MDR, 17 (56,7%) ESC-R, 9 (30%) CARB-R, além de 9 (30%) que apresentavam enterobactérias sensíveis (Não MDR, ESC-S e CARB-S) ou sem TSA. Um não apresentou culturas positivas para enterobactérias, o que indica infecção por outro tipo de micro-organismo.

As infecções mais comuns foram de trato urinário (15,2% - 10/66) e pneumonia (13,6% - 9/66), tanto para pacientes com enterobactérias MDR, quanto ESC-R. Entretanto, dos pacientes com enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, a maioria apresentava pneumonia (7/9 - 55,5%).

Um total de 12 pacientes não apresentavam infecção e não foram reportados como colonizados, mas foram positivos para enterobactérias MDR. Além de MDR, duas delas eram ESC-R e seis eram ESC-R e CARB-R. Metade desses pacientes estavam internados na EMG, o que pode indicar que essas bactérias resistentes estejam circulando na comunidade. Um resultado como esse, reforça a importância das culturas de vigilância, para que medidas mais efetivas de controle da disseminação desses micro-organismos resistentes sejam tomadas.

Alguns fatores de risco para adquirir micro-organismos com determinados fatores de resistência são: uso anterior ou recente de antimicrobianos; longo tempo de internação; admissão em UTI; uso de

dispositivos médicos invasivos; estado funcional comprometido; idade avançada; recebimento de transplantes; etc. (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015).

Um total de 72,7% (48/66) dos pacientes haviam realizado tratamento com antimicrobianos. Dos 28 pacientes com enterobactérias ESC-R, nove (32,1%) foram submetidos ao tratamento com cefalosporinas de terceira e quarta geração (ESC). Dos 16 pacientes com enterobactérias CARB-R, seis (9,1%) fizeram tratamento com ESC, nove (13,6%) com carbapenêmicos e cinco com polimixina B (7,6%).

Dos 66 pacientes, 43 (65,2%) fizeram uso de dispositivos invasivos, como cateteres, sondas, drenos, respiradores/ventiladores, etc. Desses pacientes, 28 apresentavam enterobactérias MDR, 24 ESC-R e 12 CARB-R, 10 apresentavam enterobactérias sensíveis e somente três não apresentavam enterobactérias.

De todos os pacientes, 36 (54,5%) foram admitidos em UTI, desses, 23 foram positivos para enterobactérias MDR, 20 ESC-R e 12 CARB-R, nove apresentavam enterobactérias sensíveis e dois foram negativos.

Tabela 9: Correlação dos resultados obtidos para os isolados de enterobactérias com dados clínicos do projeto HAIMP.

| DADOS CLÍNICOS | PACIENTES | | POSITIVOS PARA PELO MENOS UMA ENTEROBACTÉRIA (N = 61) | | | | | | | | NEGATIVO PARA ENTEROBACTÉRIAS | |
|------------------------------------|-----------|-------|---|-------|-------|-------|--------|-------|--------------|-------|-------------------------------|------|
| | | | MDR | | ESC-R | | CARB-R | | SENSÍVEL/NT* | | | |
| TOTAL | 66 | 100% | 35 | 53,0% | 28 | 42,4% | 16 | 24,2% | 26 | 39,4% | 5 | 7,6% |
| DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO | | | | | | | | | | | | |
| Infecção | 30 | 45,5% | 20 | 30,3% | 17 | 25,8% | 9 | 13,6% | 9 | 13,6% | 1 | 1,5% |
| Colonização | 3 | 4,5% | 2 | 3,0% | 2 | 3,0% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 1 | 1,5% |
| Sem infecção ou colonização | 32 | 48,5% | 12 | 18,2% | 8 | 12,1% | 6 | 9,1% | 17 | 25,8% | 3 | 4,5% |
| NI | 1 | 1,5% | 1 | 1,5% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| TIPOS DE INFECÇÃO | | | | | | | | | | | | |
| Abdominal | 5 | 7,6% | 2 | 3,0% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 2 | 3,0% | 1 | 1,5% |
| Pneumonia | 9 | 13,6% | 7 | 10,6% | 6 | 9,1% | 5 | 7,6% | 2 | 3,0% | 0 | 0,0% |
| Sepse | 3 | 4,5% | 2 | 3,0% | 2 | 3,0% | 1 | 1,5% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% |
| Sítio cirúrgico | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% |
| Trato urinário | 8 | 12,1% | 6 | 9,1% | 5 | 7,6% | 1 | 1,5% | 2 | 3,0% | 0 | 0,0% |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------|----------|------|---------|------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|
| Trato urinário + Corrente sanguínea | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% |
| Trato urinário + Pneumonia | 1 | 1,5% | 1 | 1,5% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| NI | 2 | 3,0% | 2 | 3,0% | 2 | 3,0% | 2 | 3,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| USO DE ANTIMICROBIANO | 48 | 72,7% | 30 | 45,5% | 26 | 39,4% | 14 | 21,2% | 13 | 19,7% | 5 | 7,6% |
| Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ESC) | 18 | 27,3% | 9 | 13,6% | 9 | 13,6% | 6 | 9,1% | 5 | 7,6% | 3 | 4,5% |
| Carbapenêmico | 14 | 21,2% | 13 | 19,7% | 12 | 18,2% | 9 | 13,6% | 13 | 19,7% | 0 | 0,0% |
| Polimixina | 7 | 10,6% | 6 | 9,1% | 6 | 9,1% | 5 | 7,6% | 1 | 1,5% | 0 | 0,0% |
| USO DE DISPOSITIVO INVASIVO | 43 | 65,2% | 28 | 42,4% | 24 | 36,4% | 12 | 18,2% | 10 | 15,2% | 3 | 4,5% |
| ADMISSÃO EM UTI | 36 | 54,5% | 23 | 34,8% | 20 | 30,3% | 12 | 18,2% | 9 | 13,6% | 2 | 3,0% |
| TEMPO INTERNAÇÃO (média em dias) | 15 | (1-76) | 21 | (2-76) | 21 | (2-76) | 25 | (2-76) | 8 | (1-24) | 15 | (7-29) |
| IDADE (média em anos) | 61,8 | (16-106) | 57,9 | (16-83) | 59,0 | (16-83) | 55,4 | (16-74) | 67,4 | (47-106) | 69,0 | (63-77) |

Abaixo seguem alguns relatos interessantes de correlação de dados clínicos com a distribuição de enterobactérias resistentes no hospital.

Um paciente, que estava internado no hospital há 76 dias e apresentava pneumonia, foi positivo para *K. pneumoniae* com mesmo perfil nos três sítios de coleta (*swab* retal, nasal e das mãos). Essas *K. pneumoniae* eram MDR, resistentes aos carbapenêmicos e possuíam o gene *bla_{KPC}*. Esse resultado mostra que a colonização de bactérias resistentes pode se dar em diferentes sítios nos pacientes, o que indica um alto risco para disseminação desses patógenos no ambiente hospitalar.

Outro relato interessante foi observado na UTI, onde duas *K. pneumoniae* com o mesmo perfil de resistência foram detectadas no *swab* retal de um paciente e no carrinho de banho que é compartilhado entre todos os pacientes da unidade. Essas bactérias foram classificadas como MDR, resistentes às ESC, aos carbapenêmicos e ainda possuíam os genes *bla_{KPC}*, *bla_{CTXM-9}* e *bla_{SHV}*. Esse paciente estava internado há 19 dias no hospital, apresentava sepse e encontrava-se em isolamento. Apesar de ser indicado um teste de tipagem para verificar a clonalidade dessas cepas, encontrar no carrinho de banho uma bactéria com o mesmo perfil de resistência de um paciente em isolamento, denota uma quebra de barreira por falha de processo.

Outro caso interessante foi um paciente do sexo masculino, 42 anos de idade, que estava internado há 47 dias no hospital e não apresentava infecção. Ele foi admitido pela EMG, onde ficou de 2-3 dias, ficou na clínica cirúrgica por uma ou duas semanas e em seguida ficou internado na UTI de uma a duas semanas, onde fez uso de cateter venoso central. Pela cultura de vigilância realizada na UTI, ele apresentou resultados negativos para bactérias resistentes. Apesar de não apresentar infecção e não estar colonizado por bactérias resistentes, devido à falta de leito em outras unidades, ele foi transferido para a CMI, uma unidade onde estão internados preferencialmente pacientes infectados por bactérias resistentes. No momento da coleta de amostras para esse estudo, esse paciente já estava internado há mais de um mês na CMI. Da sua amostra de *swab* retal isolou-se uma *K. pneumoniae* que apresentou perfil de sensibilidade somente para amicacina, gentamicina e colistina, ou seja, foi classificada como MDR, ESC-R e CARB-R. Esse isolado apresentou os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{CTX-M-1}* e *bla_{SHV}*. Além disso, das grades de leito desse paciente foi isolada uma *Enterobacter cloacae complex*, porém, com perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Esse resultado evidencia o risco de se adquirir

bactérias resistentes durante um longo período de internação no hospital, principalmente em uma unidade de alto risco.

6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- As bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram os bacilos Gram-negativos mais distribuídos e abundantes nas amostras do projeto HAIMP coletadas de pacientes, profissionais da saúde e ambiente do HU-UFSC;
- As amostras de pacientes foram as que apresentaram maior proporção de isolados positivos de enterobactérias (44,4%), seguidas de amostras de ambiente hospitalar (16,1%) e profissionais da saúde (6,9%);
- Os *swabs* retais foram os que apresentaram maior proporção de amostras positivas (89,4%) e número de isolados de enterobactérias, seguidos das áreas de descanso e alimentação dos profissionais (40,5%);
- As unidades hospitalares apresentam proporção similar de amostras positivas para enterobactérias, com exceção do CC, que teve o menor número de isolados;
- Apesar de algumas discordâncias, os métodos de identificação microbiológica Vitek2[®] e sequenciamento do gene 16S rRNA apresentaram excelentes concordâncias a nível de gênero e de espécie - 82,8% e 90,8%, respectivamente;
- Ambos os métodos (Vitek2[®] e 16S rRNA) não permitiram a identificação dos isolados de *Pantoea spp.* a nível de espécie.
- O sequenciamento do 16S rRNA não foi eficiente na identificação de *Enterobacter cloacae complex*, apresentando ambiguidades e discordâncias com *Klebsiella oxytoca* e *Salmonella enterica*;
- Os métodos Vitek2[®] e Vitek[®] MS (MALDI-TOF) permitiram a identificação do complexo *Enterobacter cloacae*, assim como o sequenciamento do gene *rpoB*, que conseguiu chegar a nível de espécie para alguns isolados, entretanto, esses resultados necessitam confirmação;
- As enterobactérias mais abundantes foram: *E. coli* (20,1%), *K. pneumoniae* (19,4%), *Pantoea spp.* (19%) e *E. cloacae complex* (17,3%);
- *E. coli* foi mais encontrada nas amostras de pacientes (93%), principalmente *swabs* retais. *Pantoea spp.* foi mais isolada das amostras de ambiente hospitalar (90,7%). *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex* apresentaram distribuição similar entre pacientes e ambiente;
- As enterobactérias apresentaram distribuição similar entre as unidades hospitalares, com exceção de *E. coli*, que não teve isolados

no CC. A EMG apresentou a maior abundância em comparação com as demais unidades, com 14 OTUs identificadas;

- Um total de 35% das enterobactérias analisadas foram classificadas como MDR, 30,9% como ESC-R e 14,5% como CARB-R;
- *K. pneumoniae* e *E. cloacae complex* apresentaram taxas similares de isolados MDR, ESC-R e CARB-R. Enquanto *E. coli* apresentou taxas menores de resistências às ESC (15,8%) e aos carbapenêmicos (1,8%);
- Um isolado de *K. pneumoniae* proveniente de um paciente da CMI foi classificado como possível XDR, apresentando resistência a todas as classes de antimicrobianos testados, com exceção de aminoglicosídeos. Para fazer a confirmação dessa bactéria como XDR, é preciso testar a resistência a outras classes de antimicrobianos;
- O gene de resistência mais frequente foi *bla_{SHV}* (20,1%), seguido de *bla_{CTX-M-1}* (10,2%), *bla_{CTX-M-8}* (8,7%), *bla_{CTX-M-9}* (4,6%), *bla_{KPC}* (4,6%) e *bla_{CTX-M-2}* (0,4%). Os genes *bla_{NDM}*, *bla_{CTX-M-25}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXA-48}* não foram detectados nos isolados analisados;
- *K. pneumoniae* foi a espécie que apresentou maior proporção de genes de resistência (85,5%) e maior número de genes associados por isolado. As combinações encontradas foram: *bla_{SHV} + bla_{CTX-M-8}* (n = 7); *bla_{SHV} + bla_{CTX-M-1} + bla_{CTX-M-8}* (n = 6); *bla_{SHV} + bla_{KPC} + bla_{CTX-M-9}* (n = 5) e *bla_{SHV} + bla_{KPC} + bla_{CTX-M-1}* (n = 3);
- Um total de 42,9% das *E. cloacae complex* foram positivas para algum gene de resistência, sendo *bla_{CTX-M-1}* o mais frequente;
- Em *E. coli*, 19,3% dos isolados foram positivos para algum gene de resistência pesquisado, sendo *bla_{CTX-M-8}* o mais frequente;
- Apesar do TSA não ter sido realizado para o gênero *Pantoea spp.*, 5,6% dessas bactérias apresentaram genes de resistência, sendo *bla_{CTX-M-1}* o mais frequente;
- Alguns isolados que apresentaram resistência às ESCs não foram positivos para os genes de resistência pesquisados (4,5%), indicando a presença de outro mecanismo ou gene de resistência. Isso aconteceu principalmente em isolados de *E. cloacae complex*;
- Alguns isolados que apresentaram algum gene codificador de ESBL não apresentaram perfil de resistência às ESCs (2,7%), o que pode indicar a não expressão desses genes;
- Todos os isolados de *E. cloacae complex* que foram resistentes aos carbapenêmicos não apresentaram os genes de carbapenemases pesquisados, porém, a grande maioria deles apresentou um gene

ESBL. Esse resultado indica que, nesse grupo de bactérias, outros genes ou mecanismos estejam associados à resistência aos carbapenêmicos;

- A distribuição das enterobactérias MDR, ESC-R e CARB-R foi homogênea entre pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar, o que indica que os micro-organismos resistentes não estão restritos somente às amostras de pacientes e apresentam ampla disseminação pelo hospital;
- As mãos dos pacientes apresentaram uma proporção mais elevada de enterobactérias resistentes em relação aos *swabs* retais e nasais, reforçando a necessidade de higienização constante das mãos;
- Dos 66 pacientes que participaram do estudo, 53% apresentavam enterobactérias MDR, 42,4% enterobactérias resistentes às ESC e 24,2% enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos;
- De acordo com os prontuários médicos, 45,5% dos pacientes estavam infectados, 4,5% colonizados e 48,5% estavam sem infecção ou colonização, entretanto, desses pacientes, alguns foram positivos para enterobactérias MDR, ESC-R e CARB-R, o que reforça o papel das culturas de vigilância;
- As infecções mais comuns foram de trato urinário e pneumonia, tanto para pacientes com enterobactérias MDR, quanto ESC-R. Entretanto, dos pacientes com enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, a maioria apresentava pneumonia.

7. CONCLUSÕES

Esse estudo de rastreamento pôde contribuir com informações relevantes sobre a distribuição, abundância e caracterização do perfil de resistência das enterobactérias circulantes no HU-UFSC, um hospital escola, público e típico de um país em desenvolvimento.

Também comparou os resultados de identificação microbiológica obtidos por um método fenotípico e o sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA, auxiliando na compreensão das vantagens, limitações e desafios de cada método para a identificação de enterobactérias.

Os dados apresentados nesse trabalho fornecem uma visão geral da distribuição das enterobactérias nos diferentes sítios de coleta em amostras de pacientes, profissionais de saúde e ambiente hospitalar, além da distribuição em diferentes unidades hospitalares. Esses resultados podem auxiliar no delineamento de estratégias para o controle da disseminação de enterobactérias resistentes no HU-UFSC e consequentemente, contribuir na redução das taxas de IRAS nesse hospital.

8. PERSPECTIVAS

- Entender, por meio de análises filogenéticas mais aprofundadas, as discordâncias encontradas na identificação de algumas enterobactérias pelo sistema Vitek2[®] e sequenciamento do 16S rRNA, bem como pesquisar outras abordagens de análise, principalmente para melhor identificação de *Enterobacter*;
- Determinar o perfil de sensibilidade completo do isolado de *K. pneumoniae* classificado como possível XDR;
- Sequenciar os genes de resistência detectados para verificação dos subtipos circulantes no HU-UFSC;
- Fazer a tipagem molecular dos isolados de enterobactérias, a fim de determinar os perfis clonais distribuídos no HU-UFSC.

9. REFERÊNCIAS

- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Cell Press*, n. 37, p. 37–45, 2008.
- ALLEGIANZI, B. *et al.* Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, v. 377, n. 9761, p. 228–41, 2011.
- ALTMAN, D. G. *Practical Statistics for Medical Research*. [S.l.]: Chapman and Hall, 1991.
- AMBLER, R. P. *et al.* A standard numbering scheme for the class A B-lactamases. *Biochem. J.*, v. 276, p. 269–271, 1991.
- ANDRADE, L. N. *et al.* Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *Journal of clinical microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2530–5, 2014.
- ANVISA. *Crêterios Diagnósticos de Infec o Relacionada   Assistência   Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>.
- ANVISA. *Programa Nacional de Preven o e Controle de Infec es Relacionadas   Assistência   Saúde(2016-2020)*. . [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>.
- ANVISA. *Uso racional de antimicrobianos para prescritores (ATMracional) - Módulo 2*. . [S.l.: s.n.], 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/objetivos.htm>.
- BASSETTI, M. *et al.* Epidemiology and Treatment of MDR Enterobacteriaceae. *Curr Treat Options Infect Dis*, 2015.
- BIOMERIEUX. *The Vitek  MS technology*. Disponível em: <<http://www.vitekms.com/technology.html>>.
- BONNET, R. *et al.* Chromosome-Encoded Class D Beta-Lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 2004–2006, 2006.
- BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.
- BOU, G. *et al.* Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiolog a. *Enfermedades Infecciosas y Microbiolog a Clínica*, v. 29, n. 8, p. 601–608, 2011.
- BRADY, C. *et al.* Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and

- Lelliottia amnigena comb. nov., *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, n. 5, p. 309–319, 2013.
- BRENNER, D. J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. Family I. Enterobacteriaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 1, p. 408–420, 1984.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CALLAGHAN, I. Bacterial contamination of nurses' uniforms : a study. *Nursing Standard*, v. 13, n. 1, p. 37–42, 1998.
- CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CARDO, D. *et al.* Moving toward elimination of healthcare-associated infections: A call to action. *American Journal of Infection Control*, v. 38, n. 9, p. 671–675, 2010.
- CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 68, n. 12, p. 2956–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869051>>.
- CASE, R. J. *et al.* Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 278–288, 2007.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* First Descriptions of bla KPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 12, p. 4129–4130, 2009.
- CDC. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. Centers for Disease Control and Prevention. [S.l.: s.n.], 2013.
- CHAVDA, K. D. Comprehensive Analysis of Carbapenemase Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. *mBio*, v. 7, n. 6, p. e02093-16, 2016.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 228, p. 45–49, 2003.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, v. 20, p. 37–46, 1960.
- CURCIO, D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: Are you Ready for the Challenge? *Current clinical pharmacology*, v. 9, n. 1, p. 27–38, 2014.
- DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB -Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. v. 66, n. 8, p. 3376–3380, 2000.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.

Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DELÉTOILE, A. *et al.* Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea* agglomerans strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 300–310, 2009.

DIDELLOT, X. *et al.* Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet*, v. 13, n. 9, p. 601–612, 2012.

DJAHMI, N. *et al.* Epidemiology of carbapenemase-producing enterobacteriaceae and acinetobacter baumannii in Mediterranean countries. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 11, 2014.

EMERSON, D. *et al.* Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience*, v. 58, n. 10, p. 925, 2008.

FARIA-JUNIOR, C. *et al.* NDM-Producing Enterobacteriaceae Strains among Hospitals in Brasília, Brazil. *Journal of Microbiology & Experimentation*, v. 3, n. 2, p. 83, 2016.

FUJITA, A. *et al.* Characterization of piperacillin/tazobactam-resistant *Klebsiella oxytoca* recovered from a nosocomial outbreak. *PLOS One*, v. 10, n. 11, p. 1–11, 2015.

FUNKE, G. *et al.* Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 7, p. 1948–1952, 1998.

GALES, A. *et al.* Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis.*, v. 1, n. 4, p. 196–203, 1997.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008 – 2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, n. 4, p. 354–360, 2012.

GUIDRY, C. A. *et al.* Whence Resistance? *Surgical Infections*, Transmissão da resistência em UTI, v. 16, n. X, 2015.

GUO, L. *et al.* Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of thoracic disease*, v. 6, n. 5, p. 534–8, 2014.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. SUPPL.1, p. i3–i10, 2009.

HO, J.; TAMBYAH, P. A.; PATERSON, D. L. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current opinion in infectious diseases*, v. 23, n. 6, p. 546–553, 2010.

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter cloacae* Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter*

cloacae. v. 69, n. 9, p. 5306–5318, 2003.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*, v. 36, n. 5, p. 309–332, 2008.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 1887–1891, 2002.

JENKINS, S. G.; SCHUETZ, A. N. Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 87, n. 3, p. 290–308, 2012.

JONES, R. N.; MARSHALL, S. A. Antimicrobial Activity of Cefepime Tested Against Bush Group I -Lactamase-Producing Strains Resistant to Ceftazidime Clinical Isolate Study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 19, p. 33–38, 1994.

KHAJURIA, A. *et al.* First Report of bla_{NDM-1} in Raoultella ornithinolytica. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 2, p. 1092–1093, 2013.

KIIRU, J. *et al.* Analysis of beta-lactamase phenotypes and carriage of selected beta-lactamase genes among Escherichia coli strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microbiol*, v. 12, n. 1, p. 155, 2012.

KLAPPENBACH, J. A. *et al.* rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 1, p. 181–184, 2001.

KOCK, R. *et al.* Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New Microbes and New Infections*, v. 9, p. 24–34, 2016.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, v. 8, p. 1–8, 2006.

LAURETTI, L. *et al.* Cloning and Characterization of bla_{VIM}, a New Integron-Borne Metallo-beta-Lactamase Gene from a Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 7, p. 1584–1590, 1999.

LEE, C. S.; DOI, Y. Therapy of infections due to carbapenem-resistant gram-negative pathogens. *Infection and Chemotherapy*, v. 46, n. 3, p. 149–164, 2014.

LINCOPAN, N. Enterobacteria producing extended-spectrum b-lactamases and IMP-1 metallo-b-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Clin Microbiol*, v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2006.

LINCOPAN, N. *et al.* First Isolation of Metallo-beta-Lactamase-Producing

Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a Patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 516–519, 2005.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine*, v. 27, n. 2, p. 128–142, 2012.

LPSN. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Family Enterobacteriaceae*. Disponível em:
<<http://www.bacterio.net/enterobacteriaceae.html>>.

LUPO, A. *et al.* Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 77, n. 3, p. 179–194, 2013.

MAGIORAKOS, A. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. v. 26, p. 1005–1011, 1997.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

NOGUEIRA, K. S. *et al.* Distribution of extended-spectrum b-lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 2, p. 162–169, 2015.

OLIVEIRA, H. M.; SILVA, C. P. R.; LACERDA, R. A. Políticas de controle e prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil: análise conceitual. *Rev Esc Enferm USP*, Histórico políticas IRAS no Brasil, v. 50, n. 3, p. 505–511, 2016.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. *Revista de Saude Publica*, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PARUCKER, L. M. B. B. *Epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde na grande Florianópolis, com ênfase em Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus e Escherichia coli*. 2010. 147 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria : Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*, v. 119, n. 6A, p. 20–28, 2006.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEI, A. Y. *et al.* Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 12, p. 3886–3897,

2010.

PENTEADO, A. P. *et al.* Dissemination of blaIMP-1-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 63, p. 87–91, 2009.

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; ASENSI, M. D. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microbial Drug Resistance*, v. 0, n. 0, p. 1–3, 2014.

PERRY, C.; MARSHALL, R.; JONES, E. Bacterial contamination of uniforms. *Journal of Hospital Infection*, v. 48, p. 238–241, 2001.

PITTET, D. *et al.* Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *Journal of Hospital Infection*, v. 68, n. 4, p. 285–292, 2008.

POIREL, L. *et al.* Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POZA, M. *et al.* Exploring Bacterial Diversity in Hospital Environments by GS-FLX Titanium Pyrosequencing. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, 2012.

QUILES, M. G. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and arm A among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

RAHN, O. New principles for the classification of bacteria. *N Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.*, v. 2, p. 963273–286, 1937.

RIBEIRO, V. B. *et al.* Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *Journal of medical microbiology*, v. 62, n. 11, p. 1721–7, 2013.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

ROZALES, F. P. *et al.* Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 25, p. 79–81, 2014.

SAMPAIO, J. L. M. *et al.* Detection of OXA-370, an OXA-48-related class d beta-lactamase in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 6, p. 3566–3567, 2014.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on B-lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. BJM-165, p. 1–7, 2016.

SANON, M.-A.; WATKINS, S. Nurses' uniforms: How many bacteria do they carry after one shift? *Journal Public Health Epidemiology*, v. 4, n. 10, p. 311–315, 2012.

SANTOS, G. S. *et al.* Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia, Morganella and Hafnia): A Review. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, p. 794–805, 2015.

SILVA, K. E. *et al.* Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2015.

SIMMON, K. E.; CROFT, A. C.; PETTI, C. A. Application of SmartGene IDNS Software to Partial 16S rRNA Gene Sequences for a Diverse Group of Bacteria in a Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4400–4406, 2006.

SINGHAL, N. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. August, p. 1–16, 2015.

SRINIVASAN, R. *et al.* Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, p. 1–22, 2015.

STAGER, C. E.; DAVIS, J. R. Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v. 5, n. 3, p. 302–327, 1992.

STODDARD, S. F. *et al.* rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. November 2014, p. 593–598, 2015.

SUN, D. *et al.* Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 19, p. 5962–5969, 2013.

TIBBETTS, R. *et al.* Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC β -lactamase in *P. mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 9, p. 3080–3083, 2008.

TUMBARELLO, M. *et al.* Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Outcomes. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3224–3231, 2012.

VASCONCELOS, A. T. R.; OLIVEIRA, V.; GALES, C. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 9, p. 5159–5164, 2015.

VASOO, S.; BARRETO, J. N.; TOSH, P. K. Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 90, n. 3, p. 395–403, 2015.

VILLAR, H. E.; DANIEL, F.; LIVERMORE, D. M. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other β -lactams. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 40, p. 365–370, 1997.

VOS, M. *et al.* A Comparison of rpoB and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing

Studies of Bacterial Diversity. *PLoS ONE ONE*, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2012.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, v. 4, n. 10, 2009.

WATANABE, M. *et al.* Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 1, p. 147–151, 1991.

WHO. Health care without avoidable infections - The critical role of infection prevention and control. *World Health Organization*, 2016. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246235/1/WHO-HIS-SDS-2016.10-eng.pdf>>.

WHO. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. *World Health Organization*, p. 40, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf>.

WHO. The Global Patient Safety Challenge 2005e2006 “Clean Care is Safer Care”. *World Health Organization*, p. 1–25, 2005.

WIENER-WELL, Y. *et al.* Nursing and physician attire as possible source of nosocomial infections. *American Journal of Infection Control*, v. 39, n. 7, p. 555–559, 2011.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WOO, P. C. Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 10, p. 908–934, 2008.

WOZNIAK, A. *et al.* Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, p. 1270–1279, 2012.

ZAMPARETTE, C. P. *Determinação Fenotípica e Genotípica de beta-lactamases de Espectro Estendido em Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Enterobacter spp. de Pacientes Internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)*. 2014. 124 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

APÊNDICE A

TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR APLICADA (MIMA)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

"Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar".

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para melhorar o rastreamento e identificação de bactérias associadas aos eventos de infecção hospitalar, bem como a resistência ao tratamento com antibióticos. Pedimos sua colaboração através da doação de amostras de material biológico e permissão para verificar a presença de bactérias nesse material. Não houve identificação de qualquer bactéria patogênica e ela poderá ser caracterizada através de métodos que não possibilitar o melhoramento do processo de rastreamento desse microrganismo. As amostras coletadas poderão ser utilizadas em projetos futuros que envolvam análises microbiológicas e moleculares, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária e que ela não influenciará suas atividades dentro do hospital, atendimento ou tratamento. Você poderá obter todas as suas informações e poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e o local de disposição para responder qualquer pergunta ou esclarecer dúvidas que porventura pareçam. Para isso, você pode telefonar para o número (48) 3721-9712 ou para o e-mail (48) 9919-2240 e conversar com o Prof. Dra. Thaís C. M. Sincero para o número (48) 369-0830 ou (48) 9608-5829 ou pelo e-mail doutoranda@inef.fernandaerodrigues@reitoria.ufsc.br ou através do e-mail (fsc_aline@gmail.com). Você poderá entrar em contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFSC através do endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima s/nº - Rindade, CEP 88.040-900 Florianópolis/SC, pelo telefone (48) 3721-9206 ou e-mail cep@reitoria.ufsc.br.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração de aproximadamente 5 minutos, para sabermos seu histórico de internações, infecções hospitalares que já tenha tido, hábitos de higienização, etc. Também precisaremos coletar amostras de alguns locais de seu corpo com um swab - uma haste de plástico fixável com ponta de algodão. O material proveniente das amostras coletadas será guardado no Laboratório de Microbiologia Molecular sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de material biológico para verificar a presença de bactérias associadas às infecções hospitalares é um procedimento normal de rotina dentro do hospital, que não influencia em suas atividades dentro do hospital ou em seu atendimento. As informações coletadas, bem como os resultados das análises microbiológicas e moleculares, serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão proporcionar o futuro método mais eficiente de prevenção de infecções hospitalares, atuando no rastreamento contínuo e na rápida identificação de infecções, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

| | |
|--|--|
| | Rubricas: |
| | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

☐

Eu, _____, RG/órgão expedidor _____, carteira de identidade nº _____, órgão expedidor _____,

fui esclarecido sobre a pesquisa "Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar" e compreendi o propósito e relevância deste estudo e dos procedimentos aos quais serei submetido. As explicações que recebi esclarecem os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que tenho liberdade para interromper minha participação em qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não me trará nenhum prejuízo. Sei que meu nome não será divulgado, que não serei cobrado despesas e não receberei qualquer pagamento por participar do estudo. Concordo que meu material biológico e meus dados sejam utilizados na realização da pesquisa citada acima. Autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo que o evoluir e o resultado para fornecer nova autorização para realização de novas pesquisas não é mencionada neste projeto. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do voluntário ou responsável legal:

☐

☐

Em caso de assinatura pelo responsável legal:

Nome completo do responsável legal: _____

RG/órgão expedidor: _____

Grau de parentesco com o voluntário: _____

☐

☐

Assinatura da pesquisadora responsável:

☐

☐

☐

Profa. Dra. Thais C. M. Sincero

☐

☐

☐

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE B

Modelo de Questionário de Pacientes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR APLICADA (MIMA)
QUESTIONÁRIO DE PACIENTES

Unidade: _____
Paciente: _____
Leito: _____



☐

Projeto de Pesquisa:

"Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multiresistentes em ambiente hospitalar".

☐

Entrevistador: _____

Assinatura: _____

Data da entrevista (leia): ____/____/____

Unidade de atendimento do voluntário encontra-se:

() Emergência () UIC () CM () UTI () CC () _____

☐

Nome do voluntário: _____

Nº do prontuário médico: _____ Leito: _____

ID das mostras: ct: _____ O das mostras de leito: _____

Material biológico coletado:

() Swab de Etal () Swab de mãos () Swab de assa () Swab de ral () Outro, especifique _____

Dados pessoais do voluntário:

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone Res.: _____ Cel.: _____

Data de Nascimento: _____ Sexo: () M () F Profissão: _____

Dados médicos:

Motivo de atendimento no hospital: () consulta ambulatorial () atendimento emergência ()

() cirurgia eletiva () cirurgia emergência () transferência de outro hospital

Data de internação: _____

Está internado no hospital ()

() 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 semanas () 2-4 semanas () 1-2 meses () >2 meses ()

Esteve internado em outra unidade do hospital () Não () Sim ()

Qual o tempo?

| | |
|---------------|--|
| () EMG () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |
| () UIC () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |
| () UIC () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |
| () CM () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |
| () CM () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |
| () Outro () | () 1 dia () 2-3 dias () 4-5 dias () 1-2 Sem () 2-4 Sem () 1-2 m () >2 m () |

☐

Realizou o procedimento invasivo? () Sim () Não ()

| Procedimento | Qtd. de dias | Início | Fim |
|---------------------------|--------------|--------|-----|
| () Sonda vesical | () | () | () |
| () Sonda enteral | () | () | () |
| () Cat. Ven. Central | () | () | () |
| () Nutrição parenteral | () | () | () |
| () Traqueostomia | () | () | () |
| () Entubação | () | () | () |
| () Respirador/Ventilador | () | () | () |
| () Outro | () | () | () |

Realizou cirurgia? Sim Não Qual (tipo/local)? _____ Data: _____

Desenvolveu infecção ou colonização por micro-organismo durante estadia no hospital?

Não Sim: _____ Colonização: Infecção:

| Topografia (Sítio de infecção) | Data Diagnóstico | Material Coletado | Agente Identificado |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Micro-organismo apresentava resistência aos antibióticos?

Sim Não: _____ MDR? Sim Não: _____

Resistência identificada: _____

PC ESBL VRE MRSA Metalo-beta-lactamase Beta-lactamase: _____

Carbapenemase Outro, especifique: _____

Antibiótico terapia: Não Sim _____

| Antimicrobiano | Qtd. de dias | Início | Fim | Antimicrobiano | Qtd. de dias | Início | Fim |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Foi colocado em isolamento? Precaução de contato:

1 dia 2-3 dias 4-5 dias 1-2 semanas 2-4 semanas 1-2 meses >2 meses

Compartilhou quarto de banheiro com paciente durante esse período? Sim Não

Histórico Médico:

Esteve internado em alguma unidade de saúde nos últimos 2 meses? Sim Não

A internação foi há quanto tempo? 1-3 meses 4-6 meses 7-9 meses 10-12 meses

Tipo de unidade de saúde: Hospital Clínica médica Pronto atendimento

Outro, especifique: _____

Tempo de internação: 1 dia 2-3 dias 4-5 dias 1-2 semanas 2-4 semanas 1-2 meses >2 meses

Teve alguma infecção durante esse período de internação na unidade de saúde? Sim Não

Tipo/Sítio de infecção: Pneumonia Tratamento respiratório, não pneumonia Tratamento urinário Sítio cirúrgico Pele

Ferida Tecidos moles Corrente sanguínea Gastrointestinal Outro, especifique: _____

Data diagnóstica: _____ tempo de tratamento: 5d 7d 10d 14d Outro, _____

Possui doença infecciosa? Não Sim Qual? _____

Possui doença crônica? Não Sim Qual? _____

Possui condição de imunodepressão? Não Sim Qual? _____

Há alguma informação do seu histórico médico que julgar relevante que não foi abordada nas perguntas realizadas? _____

APÊNDICE C

Modelo de Questionário de Profissionais de Saúde



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR APLICADA (MIMA)

Unidade: _____
Profissional: _____



QUESTIONÁRIO DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE

Projeto de Pesquisa:

"Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar".

Entrevistador: _____ Assinatura: _____

Data da entrevista coleta: ____/____/____

Unidade onde o profissional trabalha:

() Emergência () UIC () CM () UTI () CC

Nome do voluntário: _____

ID das amostras: _____

Amostras de material biológico coletadas:

() Swab na mão () Swab de pele () Swab de elar () Outro, Especifique _____

Dados pessoais do voluntário:

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone Res.: _____ Cel.: _____

Data de Nascimento: _____ Sexo: () M () F

Profissão/cargo: () Médico () Enfermeiro () Téc. Enfermagem () Fisioterapeuta () Farmacêutico
() Psicólogo () Auxiliar de limpeza () Outro, Especifique _____

Carga horária semanal no HU-UFSC: () 44h () 40h () 30h () 20h () Outra, Especifique _____

Trabalha em outra(s) unidade(s) de saúde? () Não () Sim

Carga horária semanal em outra(s) unidade(s) de saúde: () 30h () 20h () Outra, Especifique _____

Histórico Médico:

Nos últimos 2 meses desenvolveu algum tipo de infecção? () Não () Sim

Foi orientado a não trabalhar nesse período? () Não () Sim

Tipo/sítio de infecção: () Pneumonia () Trato respiratório () Pneumonia () Trato urinário () Pele () Orofaringe

() Ouvido () Sinusite () Gastrointestinal () Outro, Especifique _____

() Data diagnóstica: _____

Antibióticoterapia: () Não () Sim. Antibiótico utilizado _____

Tempo de tratamento: () 5d () 7d () 10d () 14d () Outro, _____

Micro-organismo identificado: () Não () Sim

() *Klebsiella pneumoniae* () *Acinetobacter baumannii* () *Pseudomonas aeruginosa* () *Escherichia coli*

() *Enterococcus faecium/faecalis* () *Staphylococcus aureus* () Outro, Especifique: _____

Micro-organismo apresentava resistência aos antibióticos? () Sim () Não

Possui doença infecciosa? () Não () Sim Qual? _____

Possui doença crônica? () Não () Sim Qual? _____

Possui condição de humor depressão? () Não () Sim Qual? _____

Há alguma informação do seu histórico médico que julgar ser relevante que não foi abordada nas perguntas realizadas?

Dados da Rotina Profissional:

Utiliza EPIs?

Luvas Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Jaleco convencional Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Jaleco descartável/especial (por cima do jaleco convencional) Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Máscara Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Touca Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Óculos Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Nos seguintes procedimentos, especificadamente: _____

Pro-pé Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizei.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.

Não é utilizado.

Lavagem de Mãos:

Foi instruído sobre os procedimentos de lavagem de mãos? Sim Não

Lavo Mãos:

Antes e após todos os procedimentos que realizei.

Antes e após todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Antes e após todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato.

Uso de álcool em gel infantil:

Foi instruído sobre os procedimentos de uso de álcool em gel? Sim Não

Utilizo álcool em gel:

Antes e após todos os procedimentos que realizei.

Antes e após todos os procedimentos que envolvem pacientes.

Antes e após todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato.

Julga que a maioria de seus colegas de trabalho utilizam EPIs e realizam o procedimento de lavagem de mãos de forma adequada?

Não se aplica Sim Não. Por que?

Não receberam instruções adequadas Não deram instruções fornecidas

Os colegas de trabalho que NÃO utilizam PIS e NÃO realizam o procedimento de lavagem de mãos de forma adequada pertencem, na maioria das vezes, à(s) seguinte(s) classe(s):

* Escolha no máximo 3 opções. Número de opções escolhidas deve ser 3, conforme gravidade.

- Não se aplica
- Farmacêutico
- Médico
- Psicólogo
- Enfermeiro
- Auxiliar de limpeza
- Téc. Enfermagem
- Estudantes de medicina
- Fisioterapeuta
- Estudantes de enfermagem/técnico

Você realiza limpeza de equipamentos e utensílios deitados que recebem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento? Sim Não

Foi instruído sobre os procedimentos e produtos utilizados para limpeza de infecção desses itens? Sim Não

Foi instruído sobre os procedimentos que podem auxiliar na diminuição das taxas de infecção hospitalar? Sim Não

Tipo de instrução:

- Curso fornecido pela CCH
- Instruções fornecidas pela chefia/imunidade
- Instruções fornecidas por colegas de trabalho
- Informações coletadas em literatura/identificação de meios de comunicação

Frequência da instrução: Semanal Mensal Bimestral Trimestral Semestral Anual

Julga que essas informações são suficientes para que você possa auxiliar no controle da taxa de infecção hospitalar? Sim Não

Julga dequadas as suas condições de trabalho? Sim Não. Por que?

* Escolha no máximo 3 opções. Número de opções escolhidas deve ser 3, conforme gravidade.

- Não se aplica
- Falta de programas de capacitação/reciclagem
- Demora na identificação de pacientes com infecção
- Falta de informações sobre pacientes e m. precaução de contato/isolamento
- Procedimentos preconizados para o uso de pacientes em precaução de contato/isolamento são inadequados
- Falta de insumos e equipamentos
- Falta de estrutura física adequada
- Excesso de tarefas/responsabilidades
- Falta de profissionais/imunidade
- Carga horária de trabalho excessiva
- Baixa remuneração

Há alguma informação sua ou de outros profissionais que julgue ser relevante que não foi abordada nas perguntas realizadas?

APÊNDICE D
Relação Detalhada dos Pontos de Coleta

| AMOSTRA | UNIDADE HOSPITALAR | PONTO DE COLETA | DESCRIÇÃO |
|----------------|---------------------------|----------------------------|---|
| 1 | EMG | Profissional 1 | Mãos |
| 2 | EMG | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 3 | EMG | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 4 | EMG | Profissional 2 | Mãos |
| 5 | EMG | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |
| 6 | EMG | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 7 | EMG | Paciente 1 | Reto |
| 8 | EMG | Paciente 1 | Mãos |
| 9 | EMG | Paciente 1 | Narinas |
| 10 | EMG | Paciente 2 | Reto |
| 11 | EMG | Paciente 2 | Mãos |
| 12 | EMG | Paciente 2 | Narinas |
| 13 | EMG | Paciente 3 | Reto |
| 14 | EMG | Paciente 3 | Mãos |
| 15 | EMG | Paciente 3 | Narinas |
| 16 | EMG | Leito 1 | Grades de leito |
| 17 | EMG | Leito 1 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 18 | EMG | Leito 2 | Grades de leito |
| 19 | EMG | Leito 2 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 20 | EMG | Leito 3 | Grades de leito |
| 21 | EMG | Leito 3 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 22 | EMG | Banheiro dos Profissionais | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga |

| | | | |
|----|-----|-------------------------------|------------------------------------|
| 23 | EMG | Posto de Enfermagem | Bancada, Computador e Telefone |
| 24 | EMG | Sala de Medicamentos | Dispensador de Sabonete e Torneira |
| 25 | EMG | Sala de Medicamentos | Superfícies de Alto Contato |
| 26 | EMG | Sala de Medicação | Cadeira do Paciente |
| 27 | EMG | Sala de Medicação | Suporte de Soro |
| 28 | EMG | Área de Prescrição | Computadores |
| 29 | EMG | Sala de Procedimentos Médicos | Escovação |
| 30 | EMG | Sala de Procedimentos Médicos | Leito |
| 31 | EMG | Sala de Curativos | Superfícies de Alto Contato |
| 32 | EMG | Consultório | Leito |
| 33 | EMG | Consultório | Mesa de Computador |
| 34 | EMG | Consultório | Dispensador de Sabonete e Torneira |
| 35 | EMG | Recepção | Cadeiras da Recepção |
| 36 | EMG | Sala de Lanche | Superfícies de Alto Contato |
| 37 | EMG | Sala de Repouso Enfermagem | Superfícies de Alto Contato |
| 38 | EMG | Equipamentos de Uso Comum | Dispensador de Álcool |
| 39 | EMG | Equipamentos de Uso Comum | Carro de Medicação |
| 40 | CM1 | Profissional 1 | Mãos |
| 41 | CM1 | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 42 | CM1 | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 43 | CM1 | Profissional 2 | Mãos |
| 44 | CM1 | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |

| | | | |
|----|-----|-------------------------------|---|
| 45 | CM1 | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 46 | CM1 | Paciente 1 | Reto |
| 47 | CM1 | Paciente 1 | Mãos |
| 48 | CM1 | Paciente 1 | Narinas |
| 49 | CM1 | Paciente 2 | Reto |
| 50 | CM1 | Paciente 2 | Mãos |
| 51 | CM1 | Paciente 2 | Narinas |
| 52 | CM1 | Leito 1 | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 53 | CM1 | Leito 1 | Grades de leito |
| 54 | CM1 | Leito 1 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 55 | CM1 | Leito 2 | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 56 | CM1 | Leito 2 | Grades de leito |
| 57 | CM1 | Leito 2 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 58 | CM1 | Posto de Enfermagem | Bancada, Computador e Telefone |
| 59 | CM1 | Sala de Medicamentos | Dispensador de Sabonete e Torneira |
| 60 | CM1 | Sala de Medicamentos | Superfícies de Alto Contato |
| 61 | CM1 | Vestiário | Armários |
| 62 | CM1 | Vestiário | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 63 | CM1 | Sala de Lanche | Superfícies de Alto Contato |
| 64 | CM1 | Sala de Repouso Enfermagem | Superfícies de Alto Contato |
| 65 | CM1 | Equipamentos de Uso Comum | Dispensador de Álcool |
| 66 | CM1 | Equipamentos de | Glicosímetro |

| Uso Comum | | | |
|-----------|-----|-------------------------|---|
| 67 | CR1 | Profissional 1 | Mãos |
| 68 | CR1 | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 69 | CR1 | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 70 | CR1 | Profissional 2 | Mãos |
| 71 | CR1 | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |
| 72 | CR1 | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 73 | CR1 | Paciente 1 | Reto |
| 74 | CR1 | Paciente 1 | Mãos |
| 75 | CR1 | Paciente 1 | Narinas |
| 76 | CR1 | Paciente 2 | Reto |
| 77 | CR1 | Paciente 2 | Mãos |
| 78 | CR1 | Paciente 2 | Narinas |
| 79 | CR1 | Leito 1 | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 80 | CR1 | Leito 1 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 81 | CR1 | Leito 1 | Grades de leito |
| 82 | CR1 | Leito 2 | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 83 | CR1 | Leito 2 | Grades de leito |
| 84 | CR1 | Leito 2 | Parede de Gases e Suporte de Soro |
| 85 | CR1 | Posto de Enfermagem | Bancada, Computador e Telefone |
| 86 | CR1 | Sala de Medicamentos | Dispensador de Sabonete e Torneira |
| 87 | CR1 | Sala de Medicamentos | Superfícies de Alto Contato |
| 88 | CR1 | Sala de Curativos | Superfícies de Alto Contato |

| | | | |
|-----|-----|-------------------------------|---|
| 89 | CR1 | Sala de Lanche | Superfícies de Alto Contato |
| 90 | CR1 | Sala de Repouso Enfermagem | Superfícies de Alto Contato |
| 91 | CR1 | Equipamentos de Uso Comum | Dispensador de Álcool |
| 92 | CR1 | Equipamentos de Uso Comum | Glicosímetro |
| 93 | CC | Profissional 1 | Mãos |
| 94 | CC | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 95 | CC | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 96 | CC | Profissional 2 | Mãos |
| 97 | CC | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |
| 98 | CC | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 99 | CC | Sala de Recuperação | Grades de leito |
| 100 | CC | Sala de Recuperação | Equipamentos Médicos |
| 101 | CC | Sala de Recuperação | Superfícies de Alto Contato |
| 102 | CC | Sala Cirúrgica em Uso | Mesa Cirúrgica |
| 103 | CC | Sala Cirúrgica em Uso | Carro de Anestesia - Superfícies de Alto Contato |
| 104 | CC | Sala Cirúrgica em Uso | Bandeja do Laringoscópio |
| 105 | CC | Sala Cirúrgica em Uso | Seringas Anestesia |
| 106 | CC | Sala Cirúrgica Limpa | Mesa Cirúrgica |
| 107 | CC | Sala Cirúrgica Limpa | Foco Cirúrgico |
| 108 | CC | Sala Cirúrgica Limpa | Bomba de Infusão |
| 109 | CC | Sala Cirúrgica Limpa | Bisturi Elétrico |
| 110 | CC | Vestiário | Armários |

| | | | |
|-----|-------|----------------------------|------------------------------------|
| 111 | CC | Vestiário | Dispensador de Sabonete e Torneira |
| 112 | CC | Sala de Repouso Enfermagem | Superfícies de Alto Contato |
| 113 | CC | Sala de Lanche | Superfícies de Alto Contato |
| 114 | CC | Equipamentos de Uso Comum | Computador Enfermagem |
| 115 | CC | Equipamentos de Uso Comum | Maca |
| 116 | CC | Equipamentos de Uso Comum | Dispensador de Álcool |
| 117 | UTI-A | Profissional 1 | Mãos |
| 118 | UTI-A | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 119 | UTI-A | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 120 | UTI-A | Profissional 2 | Mãos |
| 121 | UTI-A | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |
| 122 | UTI-A | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 123 | UTI-A | Paciente 1 | Reto |
| 124 | UTI-A | Paciente 1 | Mãos |
| 125 | UTI-A | Paciente 1 | Narinas |
| 126 | UTI-A | Paciente 2 | Reto |
| 127 | UTI-A | Paciente 2 | Mãos |
| 128 | UTI-A | Paciente 2 | Narinas |
| 129 | UTI-A | Leito 1 | Grades de leito |
| 130 | UTI-A | Leito 1 | Bomba de Infusão |
| 131 | UTI-A | Leito 1 | Monitores |
| 132 | UTI-A | Leito 1 | Cortina |
| 133 | UTI-A | Leito 2 | Grades de leito |
| 134 | UTI-A | Leito 2 | Suporte de Utensílios |
| 135 | UTI-A | Leito 2 | Parede Avental |

| | | | |
|-----|-------|----------------------------|---|
| 136 | UTI-A | Leito 2 | Termômetro |
| 137 | UTI-A | Posto de Enfermagem | Bancada, Computador e Telefone |
| 138 | UTI-A | Posto de Enfermagem | Pranchetas de Prontuários Médicos |
| 139 | UTI-A | Área de Prescrição | Computador |
| 140 | UTI-A | Sala de Equipamentos | Equipamentos Médicos Limpos |
| 141 | UTI-A | Vestiário | Armários |
| 142 | UTI-A | Vestiário | Dispensador de sabonete, torneira e botão de descarga of the Bathroom |
| 143 | UTI-A | Expurgo | Superfícies de Alto Contato |
| 144 | UTI-A | Expurgo | Secadora |
| 145 | UTI-A | Sala de Repouso Médico | Superfícies de Alto Contato |
| 146 | UTI-A | Sala de Repouso Enfermagem | Superfícies de Alto Contato |
| 147 | UTI-A | Sala de Lanche | Superfícies de Alto Contato |
| 148 | UTI-B | Profissional 1 | Mãos |
| 149 | UTI-B | Profissional 1 | Vestimenta/Jaleco |
| 150 | UTI-B | Profissional 1 | Telefone Celular |
| 151 | UTI-B | Profissional 2 | Mãos |
| 152 | UTI-B | Profissional 2 | Vestimenta/Jaleco |
| 153 | UTI-B | Profissional 2 | Telefone Celular |
| 154 | UTI-B | Paciente 1 | Reto |
| 155 | UTI-B | Paciente 1 | Mãos |
| 156 | UTI-B | Paciente 1 | Narinas |
| 157 | UTI-B | Paciente 2 | Reto |
| 158 | UTI-B | Paciente 2 | Mãos |
| 159 | UTI-B | Paciente 2 | Narinas |

| | | | |
|-----|-------|---------------------------|--------------------------------|
| 160 | UTI-B | Leito 1 | Grades de leito |
| 161 | UTI-B | Leito 1 | Bomba de Infusão |
| 162 | UTI-B | Leito 1 | Monitores |
| 163 | UTI-B | Leito 1 | Cortina |
| 164 | UTI-B | Leito 2 | Grades de leito |
| 165 | UTI-B | Leito 2 | Suporte de Utensílios |
| 166 | UTI-B | Leito 2 | Parede Avental |
| 167 | UTI-B | Leito 2 | Termômetro |
| 168 | UTI-B | Posto de Enfermagem | Bancada, Computador e Telefone |
| 169 | UTI-B | Posto de Enfermagem | Geladeira |
| 170 | UTI-B | Área de Prescrição | Computador |
| 171 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Dispensador de Álcool |
| 172 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Carro de Roupas Limpas |
| 173 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Glicosímetro |
| 174 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Cafômetro |
| 175 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Carro de Banho |
| 176 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Carro de Emergência |
| 177 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Equipamento de Raio X |
| 178 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Equipamento de Ultrassom |
| 179 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Passante |
| 180 | UTI-B | Equipamentos de Uso Comum | Cadeira de Fisioterapia |
