

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Aline Fernanda Rodrigues Sereia

MICROBIOMA DO AMBIENTE, DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE
E PACIENTES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PÚBLICO
BRASILEIRO E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES RELACIONADAS À
ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo C. Grisard

Prof.^a Dr.^a Thaís C. M. Sincero

Florianópolis, SC
Março de 2018

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

Sereia, Aline Fernanda Rodrigues Sereia

MICROBIOMA DO AMBIENTE, DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE E PACIENTES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PÚBLICO BRASILEIRO E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE / Aline Fernanda Rodrigues Sereia Sereia ; orientador, Edmundo Carlos Grisard Grisard, coorientador, Thaís Cristine Marques Sincero Sincero, 2018. 320 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

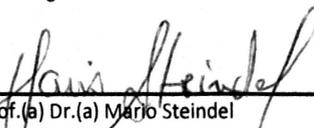
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microbioma. 3. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. 4. Resistência Bacteriana. 5. Sequenciamento de Alto Desempenho. I. Grisard, Edmundo Carlos Grisard. II. Sincero, Thaís Cristine Marques Sincero. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

"Microbioma do ambiente, de profissionais da saúde e pacientes em um hospital universitário público brasileiro e seu papel nas infecções relacionadas à assistência à saúde"

Por

Aline Fernanda Rodrigues Sereia

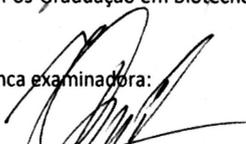
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel

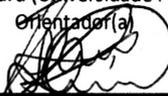
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



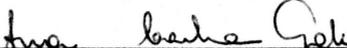
Dr.(a) Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientador(a)

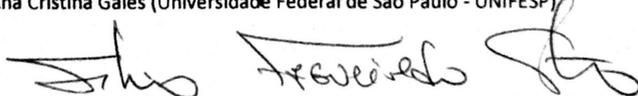


Dr.(a) Thaís Cristine Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina)

Coorientador(a)



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



Dr.(a) Silvia Figueiredo Costa (Universidade de São Paulo - USP)



Dr.(a) Emmanuel Dias-Neto (Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) - A. C. Camargo Cancer Center)

Florianópolis, 22 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que colaboraram para que esse trabalho pudesse ser realizado, que me apoiaram das mais variadas formas. Tudo na vida se torna mais leve quando temos a oportunidade de colaborar uns com outros. Por isso, deixo gravado nessas palavras os meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, que me acolheram como aluna e forneceram uma formação sólida e de qualidade.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, que forneceram bolsas a diversos membros da equipe de pesquisa, propiciando que pudessem colaborar com o trabalho.

Aos voluntários do Hospital Universitário da UFSC, pacientes e profissionais da saúde, que mesmo em um momento de dor ou de árduas tarefas, aceitaram conversar um pouquinho com a nossa equipe de pesquisa e contribuir valiosamente com o trabalho. Um agradecimento especial à equipe do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, nas figuras da Dr.^a Ivete Masukawa e Enf. Taise Klein, que nos apoiaram durante todo o período de coletas, abrindo as portas das unidades, auxiliando com as coletas de amostras e nos fornecendo todos os dados necessários.

Aos meus orientadores, Dr. Edmundo Grisard e Thaís Sincero. Vocês me aceitaram e confiaram em mim, mesmo não me conhecendo ainda tão bem. Aceitaram uma aluna que chegou com um projeto ousado e me deram liberdade para conduzi-lo. Sei que não foi fácil orientar uma aluna que estava o tempo todo dividida entre o doutorado e o trabalho na empresa. Muito grata pela paciência e pelas conversas para me tranquilizar sobre tudo o que havia para ser feito. Espero ter retribuído a confiança que depositaram em mim e que possamos colher muitos frutos juntos ainda.

Aos membros da banca, Dr.^a Ana Gales, Dr.^a Silvia Costa, Dr. Emmanuel Dias, Dr. Marcelo Pilonetto e Dr.^a Fabienne Ferreira por terem aceitado o convite em colaborar com o trabalho, avaliando e dando críticas e sugestões que o enriquecerão muito!

Ao Laboratório de Microbiologia do HU-UFSC, em especial à Dr.^a Mara Scheffer, Clarice Silva e Maria Luiza Vieira, que gentilmente compartilharam o seu tempo aos finais de semana e a estrutura e equipamentos laboratoriais para que pudéssemos realizar as etapas de microbiologia convencional.

Ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada, que me ensinou muito do que sei hoje sobre microbiologia. À querida e dedicada equipe de pesquisa: Patrícia Cunha, Daniela Tartari, Caetana Zamparete, Alejandra Estigarribia, Paula Fragoso, Suellem Gavronski e Laura Gehrke. Meninas, muito grata por tudo! Sem vocês o trabalho não teria sido realizado com tanta desenvoltura, espero que vocês possam aproveitar muito também!

À Neoprospecta, grande incentivadora e financiadora do projeto de pesquisa, empresa que em 2013 me acolheu como bolsista RHA E e já em 2014 aceitou colaborar com o meu doutorado. No final deste mesmo ano me ajudou a equilibrar os pratos quando me contratou como colaboradora, fornecendo uma valiosa oportunidade de aprender tudo e um pouco mais sobre biologia molecular e suas aplicações à microbiologia e à vida das pessoas. A Neoprospecta me deu a oportunidade de ser a bióloga que eu sempre quis ser - estimulada com o que faz no seu dia a dia e querendo avançar sempre mais. O meu agradecimento à toda equipe, especialmente de laboratório e bioinformática, que contribuíram com muitas etapas do trabalho. Um agradecimento especial a três figuras centrais: Dr. Luiz Felipe V. de Oliveira, meu coorientador de coração, com quem eu aprendi muito e quem abriu as portas para que eu pudesse realizar muitas iniciativas dentro da empresa e que desejava como profissional; minha querida amiga Dellyana Boberg, que iniciou sua trajetória na empresa comigo e que, apesar de hoje já estar alçando outros voos, sempre está em minha recordação – você me incentivou muito na realização desse trabalho, segurou todas as pontas para mim, ajudou muito como profissional e amiga confiante; à minha eterna pupila, Patrícia da Cunha – Pati, você se tornou um exemplo de profissional e eu tive a oportunidade de ver toda sua evolução, desde a graduação até se tornar minha companheira de trabalho, sou imensamente grata por essa oportunidade, você me ajudou e me ajuda muito, nunca esquecerei das suas valiosas colaborações e de sua sincera amizade.

À minha amada família, sou muito grata!

Meu querido marido, Felipe Broering, que como ele mesmo diz, doou a sua esposa ao doutorado por quatro dos cinco primeiros anos de casamento. O que vivemos juntos é algo especial, que não se circunscreve às belas palavras. Grata por me apoiar sempre, compartilhar as angústias, sorrir os sorrisos de alegria e felicidade, lutar ao meu lado e me dar o maior exemplo de paciência e generosidade que poderia ter.

Meus sogros, Lurdes e Ricardo, as cunhas queridas, Camila e Talita, grata pela compreensão nas frequentes ausências de finais de semana e feriados dos últimos anos, dedicados quase que integralmente ao doutorado. Prometo voltar a vê-los mais!

Meus pais, Maria Neide e João, e meu irmão Rodrigo. Se hoje eu estou aqui é porque vocês me trouxeram em seus carinhosos e fortes braços. A distância nunca nos separou, as lutas sempre nos uniram mais. Só nós sabemos como essa trajetória foi difícil, tudo o que tivemos que vencer juntos, mas nós vencemos! Essa etapa é mais uma conquista da nossa família. Mãe, você é minha grande guerreira, meu exemplo maior de vida, você é uma grande vencedora, nunca se esqueça disso – você conquistou o que todo o ser humano sonha em conquistar – a eternidade, por meio da recordação do imenso bem que fez àqueles à sua volta. Pai, você é o exemplo de que com trabalho árduo, propósito e honestidade pode se conquistar tudo na vida e esse tudo não é o material, se não uma vida digna e dedicada àqueles que mais amamos. Rodrigo, meu irmão, você é a leveza que um dia eu ainda quero conquistar, tudo contigo e ao seu redor acontece naturalmente, com luta sim, mas com uma leveza que alenta a alma e faz tudo parecer mais simples.

À Logosofia e à Fundação Logosófica, que se tornou um refúgio especial, de aprendizado, de colaboração com a humanidade, que me faz sentir um ser humano útil, feliz e sempre inquieto com tudo à sua volta.

Por fim, gostaria de agradecer a Aline Sereia, aquela que fez opções há alguns anos que não foram simples, que exigiriam muito de si e daqueles à sua volta. Grata por ter sido valente, que você possa conservar o frescor dessa gratidão a cada dia que virá.

*O conhecimento amplia a vida.
Conhecer é viver uma realidade que a
ignorância impede desfrutar.*

Carlos Bernardo González Pecotche

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), especialmente aquelas causadas por bactérias multirresistentes (MDR), são um problema de saúde pública, representando um risco aos pacientes e aos profissionais da saúde. O presente estudo realizou a pesquisa do microbioma do ambiente hospitalar (AH), dos profissionais da saúde (PS) e de pacientes (PT) pelo período de seis meses em um hospital universitário (Florianópolis, SC, Brasil), de forma a compreender seu papel nas IRAS. Foram coletadas, de forma pareada, amostras de PT, PS e superfícies de alto contato do AH: i) amostras dependentes de cultivo (DC), coletadas com *swabs* com meio de transporte Amies, foram submetidas ao isolamento específico de bacilos Gram-negativos (BGN), identificação fenotípica e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos; ii) amostras não dependentes de cultivo (NDC), coletadas com *swabs* secos, para as quais foi aplicado o sequenciamento de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA para identificação de bactérias. Genes codificadores de β -lactamases foram identificados por qPCR, tanto em amostras DC como NDC. As identificações específicas para as amostras DC pelo método fenotípico e pelo sequenciamento de DNA revelaram boa concordância, assim como as identificações quando se comparam as amostras DC e NDC. As análises apontam que dentre as amostras NDC coletadas, 41,6% foram classificadas como *hot spots* de contaminação, enquanto que nas amostras DC, 25,5% apresentaram crescimento positivo para BGN. Independentemente da metodologia utilizada, os *hot spots* mais frequentes foram concordantes, sendo: áreas de descanso e de trabalho dos profissionais da saúde, *swabs* retais dos pacientes e equipamentos hospitalares dos quartos dos pacientes. Para as amostras DC, mais de 30,0% dos isolados de BGN foram classificados como MDR. Os genes de resistências detectados em maior frequência foram: *bla*_{SHV-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-8 group} e *bla*_{KPC-like}. As análises de alfa e beta-diversidade permitiram observar que não há diferenças significativas na riqueza e abundância das espécies bacterianas nos diferentes grupos de amostras, como as unidades hospitalares e fontes de coleta. O estudo revelou que há ampla disseminação de bactérias associadas às IRAS no ambiente hospitalar, indicando que os profissionais da saúde, os equipamentos e superfícies do hospital são fatores chaves na disseminação de bactérias multirresistentes, estando associada a práticas não adequadas.

Palavras-chave: infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), microbioma, bactérias multirresistentes (MDR), genes de resistência.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAI), especially those caused by multidrug resistant (MDR) bacteria, are a major public health threat, representing a risk to the patients and healthcare workers. The study presented here was a hospital environment (HE), healthcare workers (HCW) and patients (PT) microbiome investigation carried out in a University Hospital (Florianópolis, SC, Brazil) during six months, to understand their role in HAI. Paired samples were collected from PT, HCW and high-touch surfaces of HE: i) culture-dependent (CD) samples collected with swabs containing Amies medium were isolated (only Gram-negative bacteria), submitted to phenotypic identification and antimicrobial susceptibility test; ii) culture-independent (CI) samples collected with dry-swabs were submitted to high-throughput sequencing of V3/V4 region of the 16S rRNA gene for bacterial identification. The most important β -lactamases genes for each species were tested by qPCR. The specific identification for CD samples by the phenotypic method and by DNA sequencing showed high concordance, as well as when CD and CI samples were compared. From the CI collected samples, 41.6% were classified as hot spots of contamination, while from the CD samples, 25.5% presented a Gram-negative bacteria (GNB) growth. Both approaches, CD and CI, recovered the same results for the most frequent hot spots: rest and work areas of the healthcare workers, rectal swabs from patients and medical equipment from patients' rooms. From the CD samples, more than 30.0% of the HAI-related GNB was MDR. The resistance genes detected with higher frequencies were: *bla*_{SHV-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{CTX-M-1-group}, *bla*_{CTX-M-8-group} and *bla*_{KPC-like}. The alpha and beta-diversity analyses showed that there are no significant differences in the richness and abundance of bacterial species in the different groups of samples, such as hospital units and collection sources (PT, HCW and HE). The study revealed that there is a wide spread of HAI related bacteria within the hospital environment, indicating that healthcare workers, hospital areas and equipment are key factors on MDR bacteria dissemination, being associated with inappropriate practices.

Keywords: healthcare-associated infections (HAI), microbiome, multidrug resistant bacteria (MDR), resistance-related genes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de ação e mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos.	56
Tabela 2. Descrição e distribuição das amostras coletadas em duplicata para análises DC e NDC pelo projeto HAIMP de abril a setembro de 2015.....	95
Tabela 3. Concordância entre a identificação realizada pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 235 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).....	106
Tabela 4. Concordância entre a identificação realizada pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).....	109

Item 6.2 Artigo científico

Table 1. Phenotypic identification of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	119
Table 2. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	126
Table 3. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of <i>Enterobacter cloacae</i> isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	127
Table 4. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of <i>Escherichia coli</i> isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	128
Table 5. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of <i>Acinetobacter</i> spp. isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	131
Table 6. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of <i>Pseudomonas</i> spp. isolated from patients (PT) and hospital environment and equipment (HE). ...	133

Table S1. List of the sampling points in the Emergency (EMG), Internal Medicine Ward (IMW), Surgical Inpatient Unit (SUW), General Surgery Unit (GSU) and Intensive Care Unit A and B (ICU-A and ICU-B) of Professor Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital, Florianópolis, SC, Brazil.....	154
Table S2. Panel of antimicrobial resistance-related genes tested by quantitative PCR (qPCR) on Gram-negative bacteria (GNB) isolates related to healthcare associated infection (HAI) obtained in this study.	160
Table S3. Distribution of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) and their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile, according to the hospital units...	162
Table S4. Distribution of gram-negative bacteria (GNB) species related to healthcare associated infection (HAI) isolated from distinct hospital areas, patients (PT) and healthcare workers (HCW) according to their sampling sites and to their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile.	163
Table S5. Distribution of of Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp. and Pseudomonas spp. isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW) and their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile.	165
Table S6. Frequencies of the beta-lactamases resistance genes identified in the total (TT) samples of each gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) group and for the most important GNB species isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).	166
Table S7. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of Acinetobacter baumannii isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	169
Table S8. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).....	170

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em países de renda alta (a) e em países de baixa e média rendas (b) entre 1995 e 2010. Para países com mais de um estudo foi considerado o estudo mais recente.	43
Figura 2. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea (IPCS) associada a cateter venoso central (CVC) em pacientes adultos hospitalizados em UTI em 2015 no Brasil.....	47
Figura 6. Porcentagens dos fenótipos de resistência entre os bacilos Gram-negativos (BGN) mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea associada a cateter venoso central (IPCS-AC) em pacientes adultos hospitalizados em UTI em 2015 no Brasil.....	70
Figura 7. Principais rotas de transmissão de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no ambiente hospitalar.....	74
Figura 5. Desenho experimental utilizado para a coleta e processamento de amostras biológicas do projeto “Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar”.....	92
Figura 9. Estrutura final de uma biblioteca de DNA para sequenciamento de alto desempenho, baseada da abordagem TruSeq (Illumina Inc., USA).....	99
Figura 10. Fórmulas matemáticas que compõe o pipeline Sentinel e são utilizadas como filtro de qualidade das sequências de DNA de interesse, obtidas pelo sequenciamento de alto desempenho.....	100
Figura 11. Abundâncias relativas para espécies e gêneros associados às IRAS mais comumente identificados pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC).	111
Figura 12. Abundâncias relativas para espécies e gêneros identificados pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC)...	112
Figura 13. Abundâncias relativas para espécies identificadas pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em swabs retais de pacientes e swabs das superfícies de alto contato das áreas de descanso dos profissionais da saúde, nas amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).....	113

Figura 11. Caracterização do grupo de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados.	174
Figura 12. Caracterização do grupo de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados e consulta a prontuários: diagnóstico de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) e uso de antimicrobianos.	175
Figura 13. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados.	178
Figura 14. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: instrução sobre higienização de mãos.	179
Figura 15. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: instrução sobre controle de infecções relacionadas à assistências à saúde (IRAS).	180
Figura 16. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: condições de trabalho.	181
Figura 17. Esquema da planta baixa das Unidades de Terapia Intensiva A e B do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.	184
Figura 18. Mapas de risco das Unidades de Terapia Intensiva A e B do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).	185
Figura 19. Perfil genético de <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR identificadas em swab retal e grades de leito de paciente da Unidade de Terapia Intensiva-B (UTI-B) isoladas no mês de agosto.	187
Figura 20. Esquema da planta baixa da Clínica Médica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.	188
Figura 21. Mapas de risco da Clínica Médica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de	

abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).	189
Figura 22. Perfil genético de <i>Acinetobacter baumannii</i> identificada em swab das mãos (amostras não dependentes de cultivo – NDC) de dois pacientes da Clínica Médica I no mês de abril.	191
Figura 23. Esquema da planta baixa da Clínica Cirúrgica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.	193
Figura 24. Mapas de risco da Clínica Cirúrgica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).	194
Figura 25. Esquema da planta baixa do Centro Cirúrgico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.	195
Figura 26. Mapas de risco do Centro Cirúrgico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).	196
Figura 27. Esquema da planta baixa da Emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.	198
Figura 28. Mapas de risco da Emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).	199
Figura 29. Classificação das amostras não dependentes de cultivo (NDC) como “hot spots” ou “non-hot spots” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). ...	200
Figura 30. Classificação das amostras não dependentes de cultivo (NDC) como “hot spots” ou “non-hot spots” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo a fonte de coleta.	201
Figura 31. Proporção de amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).	202
Figura 32. Proporções das amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo a fonte de coleta.	202

Figura 33. Proporções de grupos de amostras do ambiente e equipamentos hospitalares, não dependentes de cultivo (NDC), classificadas como “hot spots” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).....	204
Figura 34. Proporções de grupos de amostras do ambiente e equipamentos hospitalares, dependentes de cultivo (DC), coletadas no primeiro semestre de análises e positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).....	204
Figura 35. Proporções das amostras não dependentes de cultivo (NDC) classificadas como “hot spots” ou “non-hot spots” e proporções das amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN), segundo as diferentes unidades hospitalares.	206
Figura 36. Proporções dos Pontos Críticos de Contaminação (PCC) para os grupos de amostras não dependentes de cultivo (NDC), de acordo com a recorrência de “hot spots”, e dependentes de cultivo (DC), de acordo com a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).	207
Figura 37. Espécies bacterianas identificadas pelo sistema Vitek®2 nas amostras dependentes de cultivo (DC) e pelo sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA nas amostras não dependentes de cultivo (NDC) e classificadas como pontos críticos de contaminação (PCC).	209
Figura 38. Genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos identificados por PCR quantitativa (qPCR) nas amostras dependentes de cultivo (DC) e nas amostras não dependentes de cultivo (NDC) classificadas como pontos críticos de contaminação (PCC).	210
Figura 39. Mapa de calor das frequências de genes de resistência codificadores de beta-lactamases identificadas em amostras não dependentes do cultivo (NDC) e suas respectivas médias dos ciclos de quantificação (Cq).....	211
Figura 40. Mapa de calor das frequências de genes de resistência codificadores de beta-lactamases identificadas em amostras não dependentes do cultivo (NDC) correspondentes às amostras dependentes de cultivo (DC) que foram positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN).	213
Figura 41. Acompanhamento da identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i> em amostras dependentes de cultivo (DC) e nas amostras não dependentes de cultivo (NDC).....	215

Figura 42. Perfil genético de <i>Acinetobacter baumannii</i> identificada em amostras não dependentes de cultivo (NDC), incluindo todas as unidades hospitalares, no mês de setembro.	216
Figura 43. Índices de alfa-diversidade <i>Chao1</i> , <i>Shannon</i> , Diversidade de <i>Simpson</i> e Dominância de <i>Simpson</i> calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies de bactérias associadas às IRAS, separados de acordo com as diferentes unidades hospitalares.	219
Figura 44. Índices de alfa-diversidade <i>Chao1</i> , <i>Shannon</i> , Diversidade de <i>Simpson</i> e Dominância de <i>Simpson</i> calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies de bactérias associadas às IRAS, separados de acordo com as diferentes fontes de coleta.	221
Figura 45. Índices de alfa-diversidade <i>Chao1</i> , <i>Shannon</i> , Diversidade de <i>Simpson</i> e Dominância de <i>Simpson</i> calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies de bactérias associadas às IRAS, separados de acordo com os diferentes locais/sítios de coleta.	222
Figura 46. Índices de alfa-diversidade de <i>Shannon versus</i> Diversidade de <i>Simpson</i> de acordo com as diferentes unidades hospitalares, fontes de coleta e locais/sítios de coleta.	224
Figura 47. Índices de beta-diversidade <i>Bray Curtis</i> (A) e <i>Jaccard</i> (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com os meses de coleta.	225
Figura 48. Índices de beta-diversidade <i>Bray Curtis</i> (A) e <i>Jaccard</i> (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com as unidades hospitalares.	226
Figura 49. Índices de beta-diversidade <i>Bray Curtis</i> (A) e <i>Jaccard</i> (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com as diferentes fontes de coleta.	227
Figura 50. Índices de beta-diversidade <i>Bray Curtis</i> (A) e <i>Jaccard</i> (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com os diferentes locais/sítios de coleta.	228
Figura 51. Índices de beta-diversidade <i>Bray Curtis</i> para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma dos pacientes, de acordo com os diferentes sítios de coleta.	230
Figura 52. Índice de beta-diversidade de <i>Bray Curtis</i> para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma de pacientes e	

seus respectivos leitos de internação, separados de acordo com as diferentes fontes (A) e locais/sítios de coleta (B).	231
Figura 53. Índice de beta-diversidade de <i>Bray Curtis</i> para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma de pacientes e profissionais da saúde, separados de acordo com as diferentes fontes (A) e sítios de coleta (B).....	232
Figura 54. Agrupamento de amostras em <i>heatmap</i> segundo as bactérias associadas às IRAS mais abundantes nos diferentes locais/sítios de coleta.....	234
Figura 55. Árvore da abundância dos filos, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma do ambiente hospitalar.....	236
Figura 56. Árvore da abundância dos filos, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma dos profissionais da saúde.....	237
Figura 57. Árvore da abundância dos filos, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma dos pacientes.	238
Figura 58. Abundância relativa das espécies de bactérias associadas às IRAS mais prevalentes, de acordo com a fonte de coleta (A), unidades hospitalares (B) e local/sítio de coleta (C).	239

Item 6.2 Artigo científico

Figure 1. Abundance of Gram negative bacteria in patients (PT), hospital environment/equipment (HE) and healthcare workers (HCW) (N = 310).....	121
Figure 2. Abundance of Gram negative bacteria in the six hospital units - Surgical Ward (SUW), Internal Medicine Ward (IMW), General Surgery Unit (GSU), Intensive Care Unit A and B (ICU-A and ICU-B) and Emergency (EMG) (N = 310).	122
Figure 3. Abundance of Gram negative bacteria in the different areas of the hospital or the isolation sites (N = 310).	123
Figure 4. Proportion of MDR (multidrug resistant), ESC-R (extended-spectrum cephalosporins resistant) bacteria and carbapenem resistant bacteria in patients (PT), hospital environment/equipment (HE) and healthcare workers. A: Proportions for Enterobacteriaceae; B: Proportions for Acinetobacter spp.; C: Proportions for Pseudomonas spp.....	129
Figure 5. Heat map showing the frequencies of the beta-lactamases resistance genes identified in the total (TT) samples of each gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) group and for the most important GNB isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HW).	135

Figure S1. Abundance of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW) (Phenotypic identification)..... 161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC – associado ao cateter.
- AH – ambiente e equipamentos hospitalares
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil).
- AST – do inglês, *antimicrobial susceptibility test*.
- ATCC – do inglês, *American Type Culture and Collection*.
- BGN – bacilos Gram-negativos.
- BHI – do inglês, *Brain Heart Infusion* (meio de cultura).
- BIP – respirador tipo *bipap*.
- BrCAST – do inglês, *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- CARB R – resistência aos carbapenêmicos ou, do inglês, *carbapenem resistance*.
- CAT – cateter.
- CC – centro cirúrgico.
- CCIH – comissão de controle de infecção hospitalar.
- CCIRAS – comissão de controle de infecção relacionada à assistência à saúde.
- CD – do inglês, *culture-dependent*.
- CDC – do inglês, *Centers for Control Disease and Prevention* (Estados Unidos).
- CFU – do inglês, *colony-forming units*.
- CI – do inglês, *culture-independent*.
- CMI – clínica médica I.
- CRI – clínica cirúrgica I
- CVC – cateter venoso central.
- DC – dependente de cultivo.
- DNA – ácido desoxirribonucleico.
- DRE – dreno.
- ECDC – do inglês, *European Centre for Disease Prevention and Control*.
- EMG – unidade de emergência ou, do inglês, *emergency unit*.
- ESC R – resistências às cefalosporinas de amplo espectro ou, do inglês, *extended-spectrum cephalosporins resistant*.
- GNB – Gram-negative bacteria.
- HAI – do inglês, *healthcare associated infections*.
- HE – do inglês, *healthcare environment*.
- HCW – do inglês, *healthcare worker*.
- ICS – infecção de corrente sanguínea.
- ICU – do inglês, *intensive care unit*.

IGI – infecção gastrointestinal.
IPCS – infecção primária de corrente sanguínea.
IRAS – infecções relacionadas à assistência à saúde.
ISC – infecção de sítio cirúrgico.
ITU – infecção de trato urinário.
MBL – metalo-beta-lactamases.
MDR – do inglês, *multi-drug resistant*.
IMW – do inglês, *internal medicine ward*.
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
NDC – não dependente de cultivo.
NHSN – do inglês, *National Healthcare Safety Network*.
NPA – nutrição parenteral.
PAV – pneumonia associada à ventilação mecânica.
Pb – par de bases
PCC – ponto crítico de contaminação.
PDR – do inglês, *pandrug-resistant*.
PLE – infecção de pele.
PNCIH – programa nacional de controle de infecção hospitalar.
PNM – pneumonia.
PNPCIRAS – plano nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde.
POC – do inglês, *point of care*.
PS – profissionais da saúde.
PT – pacientes ou, do inglês, *patients*.
qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa.
RNA – ácido ribonucleico.
RVE – respirador ou ventilador mecânico.
SCIRAS – serviço de controle de infecção relacionada à assistência à saúde.
SEN – sonda enteral.
SEP – sepse.
SUW – do inglês, *surgical ward*.
GSU – do inglês, *general surgery unit*.
SVE – sonda vesical.
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido.
TSA – teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.
UFC – unidades formadoras de colônia.
UTI – unidade de terapia intensiva.
VRE – do inglês, *Vancomycin Resistant Enterococci*
WHO – do inglês, *World Health Organization*.
XDR – do inglês, *extensively drug-resistant*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	32
2.1 Infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS)	32
2.1.1 O combate às IRAS no Brasil: um breve histórico.....	34
2.1.2 Dados mundiais sobre as IRAS e estratégias de combate	38
2.1.3 Principais IRAS e microrganismos associados	46
2.2 Resistência aos antimicrobianos.....	48
2.2.1 Principais antimicrobianos e mecanismos de resistência associados.....	53
2.2.2 Principais bactérias resistentes associadas às IRAS.....	66
2.3 O papel do ambiente e dos profissionais da instituição de saúde nas IRAS	72
2.4 Novas tecnologias para o combate às IRAS.....	82
3 HIPÓTESE	88
4 OBJETIVO GERAL.....	88
4.1 Objetivos específicos.....	88
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
5.1 Desenho experimental	89
5.2 Local de estudo e amostras biológicas.....	93
5.2.1 Amostras de pacientes.....	96
5.2.2 Amostras de profissionais da saúde.....	97
5.2.3 Amostras do ambiente hospitalar.....	97
5.3 Análises realizadas em amostras não dependentes de cultivo (NDC).	98
5.3.1 Extração de DNA.....	98
5.3.2 Sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3- V4 do gene 16S rRNA.....	98
5.3.3 Identificação de genes codificadores de beta-lactamases por PCR quantitativa em tempo real.....	101
5.4 Análises realizadas em amostras dependentes de cultivo (DC). 	102
5.4.1 Cultura celular bacteriana.....	102
5.4.2 Identificação fenotípica.....	102
5.4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	102
5.4.4 Extração de DNA	103

5.4.5	Identificação de genes codificantes de beta-lactamases por PCR quantitativa em tempo real.....	104
5.4.6	Sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3-V4 do gene 16S rRNA.	104
5.5	Análise estatística	104
6	RESULTADOS	105
6.1	Comparação da identificação de espécies de bacilos Gram-negativos associados às IRAS obtidos por métodos com (DC) e sem o cultivo celular (NDC).....	105
6.2	Caracterização da resistência aos antimicrobianos em isolados de bacilos Gram-negativos associados às IRAS	114
6.3	A determinação do microbioma hospitalar como ferramenta de manejo para o controle e a prevenção de IRAS.....	171
6.3.1	Caracterização dos grupos amostrais de pacientes, profissionais da saúde e do ambiente hospitalar segundo dados dos questionários.....	171
6.3.2	Identificação de pontos críticos de contaminação por bactérias associadas às IRAS	182
6.3.3	Análise das medidas de diversidade do microbioma hospitalar.....	217
7	DISCUSSÃO.....	240
8	CONCLUSÕES.....	260
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	261
	REFERÊNCIAS.....	263
	ANEXO 1 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	284
	ANEXO 2 Questionários.....	288
	ANEXO 3 Descrições dos pontos de coleta de amostras biológicas...307	
	ANEXO 4 Lista de espécies associadas às IRAS.....	317

1 INTRODUÇÃO

Ao redor do mundo, o risco de adquirir uma infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) é uma realidade que atinge todas as instituições que se ocupam do cuidado à saúde humana. Apesar da importância das IRAS, a *World Health Organization* (WHO) não as inclui na lista de doenças que, devido à sua importância em termos de morbidade e mortalidade, são regularmente avaliadas e para as quais são divulgados os dados que servem de ferramentas aos profissionais de saúde, aos tomadores de decisão e ao público em geral. Segundo a própria instituição, isso se deve ao diagnóstico complexo das IRAS, dependente de múltiplos critérios, e à inexistência ou ineficiência dos sistemas nacionais de vigilância (WHO, 2011).

De forma associada, a resistência aos antimicrobianos também se tornou um problema que preocupa todos os países, independentemente da sua faixa de renda. Segundo o documento “*Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*” até 2050 as mortes atribuídas à resistência aos antimicrobianos deve chegar a 10 milhões ao ano (sendo Ásia e África os continentes com maior mortalidade), com redução de 2,0% a 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB) e custos associados ao redor do mundo de 100 trilhões de dólares (O’NEILL, 2014). Apesar dos indicadores que parecem levar o mundo de volta ao cenário no qual pessoas podem morrer por infecções consideradas simples, por falta de opções de tratamentos eficazes, surgem possibilidades de soluções que, se tomadas coletivamente, podem reverter ou amenizar esse cenário, como (O’NEILL, 2014):

- Incentivo a pesquisas inovadoras para o desenvolvimento de novas drogas, vacinas e terapias alternativas.
- Iniciativas de instituições governamentais e sem fins lucrativos para identificar e fomentar pesquisas colaborativas e inovadoras, contendo ações que podem ser implementadas com maior chance de sucesso.
- Avanços na genética, genômica e ciência da computação que podem mudar a forma como as infecções e a resistência aos antimicrobianos são diagnosticadas, detectadas e reportadas ao redor do mundo, de forma que possam ser combatidas com maior agilidade.
- Crescimento sustentável de países de baixa e médias rendas, com investimentos em saneamento e infraestrutura básica de saúde, de forma a proteger a população de taxas elevadas de infecção.

Os ambientes das instituições de assistência à saúde humana são peças-chaves nos processos de disseminação das IRAS e da resistência aos antimicrobianos. Os microrganismos que habitam essas instituições podem influenciar a recuperação do paciente e o desfecho da doença. No entanto, os dados sobre a complexa dinâmica dessas comunidades microbianas ainda foram pouco explorados, principalmente devido ao fato de muitos estudos serem focados em espécies cultiváveis e clinicamente relevantes. Em 2017, foram publicados dados de um importante projeto de pesquisa desenvolvido pela Universidade de Chicago, nos Estados Unidos, que teve como objetivo compreender, no âmbito comunitário, como as bactérias colonizam e se movem através do ambiente hospitalar, de forma a caracterizar a dinâmica bacteriana entre superfícies hospitalares, pacientes e profissionais da saúde (LAX *et al.*, 2017). As coletas de amostras biológicas foram realizadas ao longo de um ano, enquanto um novo hospital, na cidade de Chicago, se tornava operacional. Os resultados demonstraram claramente a mudança da diversidade bacteriana nos períodos pré e pós ocupação do hospital, além da correlação da microbiota do paciente com o ambiente do seu leito de internação e da microbiota dos profissionais da saúde com os postos de enfermagem onde trabalham, por exemplo. Os autores alertam que, embora os resultados do estudo representem um avanço no conhecimento das comunidades microbianas associadas aos hospitais, os dados são limitados em sua capacidade de proporcionar impacto clínico imediato devido à natureza observacional (e não intervencional) do estudo (LAX *et al.*, 2017).

A partir dos dados apresentados, uma questão central pode ser colocada: a tecnologia está a favor de soluções inovadoras para problemas de saúde pública. Já são conhecidos trabalhos científicos que utilizam dados de sequenciamento completo de genoma bacteriano para elucidar surtos de IRAS (FITZPATRICK; OZER; HAUSERB, 2016; AZARIAN, *et al.*, 2015; SNITKIN *et al.*, 2012; DIDELOT; BOWDEN; WILSON, 2012), para poder contê-los de forma mais eficaz no futuro. O estudo do microbioma a partir de tecnologias baseadas em sequenciamento de alto desempenho podem elucidar questões importantes sobre as IRAS, especialmente sobre a interação das comunidades microbianas entre os ambientes das instituições de saúde, profissionais e pacientes e seu impacto na disseminação das IRAS, não restrito às espécies cultiváveis. Tendo como foco a segurança do paciente, em um futuro próximo, a consolidação desses dados permitirá o uso dessas novas tecnologias no diagnóstico rápido e na prevenção de IRAS, por exemplo, como ferramentas de monitoramento e adequação

dos ambientes das instituições de saúde e capacitação de equipes de profissionais da saúde. Os perfis de resistência dos microrganismos implicados nas IRAS podem ser precocemente preditos por técnicas de biologia molecular, diminuindo o empirismo, principalmente nas etapas iniciais do tratamento com antimicrobianos, fato que, além de favorecer a escolha de um tratamento mais assertivo, permitindo seu maior sucesso, auxilia o uso racional dos antimicrobianos, diminuindo as taxas de resistência para as gerações futuras (O'NEILL, 2015a).

Porém, é possível introduzir essas tecnologias no dia a dia do hospital? Essa seria uma abordagem custo-efetiva para combate às IRAS? Teria o ambiente um papel relevante na disseminação das IRAS? Em caso positivo, as medidas de higienização de mãos e técnicas de assistência ao paciente aplicadas de forma correta pelos profissionais da saúde, por exemplo, não seriam suficientes para o controle de IRAS? Essas perguntas levantam uma reflexão sobre a quantificação de risco ao paciente: quanto maior for a atuação no sentido de diminuir os fatores de risco, maior será a segurança do paciente. Quanto maior for o investimento no sentido da não ocorrência da doença, maior será o retorno social e financeiro para a população e instituições do sistema de saúde. Apesar de serem afirmações aparentemente lógicas, as mesmas precisam ser demonstradas e comprovadas.

O papel do presente estudo é trazer à tona dados sobre a composição da microbiota bacteriana e sobre os perfis de resistência aos antimicrobianos de uma instituição de saúde pública, com características típicas de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, de forma a aumentar a compreensão sobre a dinâmica das comunidades bacterianas entre pacientes, profissionais da saúde e o ambiente hospitalar e sua relação com as IRAS. Para isso, foram utilizadas metodologias convencionais, dependentes do cultivo celular, e novas tecnologias, não dependentes do cultivo celular, como o sequenciamento de DNA alto desempenho, o que possibilita o entendimento sobre a contribuição de cada uma delas na elucidação da relação entre o microbioma da instituição e as IRAS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS)

Segundo a Lei nº 9.431, Art. 1º, § 2º, entende-se por infecção hospitalar, também denominada institucional ou nosocomial, qualquer infecção adquirida após a internação de um paciente em hospital e que se manifeste durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1997).

Na década de 1990, porém mais rotineiramente na década de 2000, o termo “Infecção Hospitalar” passou a ser substituído pelo termo “Infecção Relacionada à Assistência à Saúde” ou IRAS, como uma forma de ampliar o conceito, uma vez que essas infecções não ocorrem apenas no âmbito do hospital, mas sim podem ser adquiridas e afetar qualquer instituição que se ocupe da assistência à saúde humana, como clínicas, casas de repouso, centros de diagnóstico e etc. Esse movimento foi uma resposta ao movimento mundial, que também substituiu o termo em inglês “*Hospital Infection*” pelo termo “*Healthcare Associated Infection*” ou HAI (WHO, 2011a; HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

Em 2008, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos, estabeleceu e publicou definições importantes, a serem utilizadas no NHSN (em inglês, *National Healthcare Safety Network*), sobre o que pode ou não ser considerado como uma infecção relacionada à assistência à saúde, a classificação das IRAS em categorias, além dos critérios diagnósticos para cada tipo de IRAS, agrupadas nessas categorias. Algumas dessas definições, que têm sido adotadas mundialmente, são apresentadas a seguir (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008):

- *Healthcare Associated Infection*, HAI (Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, IRAS): infecção localizada ou sistêmica resultante de uma reação adversa à presença de um ou mais agentes infecciosos ou ainda de sua(s) toxina(s). Não deve haver evidência de que a infecção estava presente ou incubada no momento da admissão na instituição de saúde. Cabem as seguintes considerações:
 - IRAS podem ser causadas por agentes infecciosos de fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas são sítios corporais, como a pele, o nariz, a boca, o trato gastrointestinal ou a vagina, que são normalmente habitados por microrganismos. Fontes exógenas são

aquelas externas ao paciente, tais como os profissionais da saúde, visitantes, equipamentos de assistência ao paciente, dispositivos médicos ou o ambiente da instituição de saúde.

- Não são consideradas IRAS:
 - Infecções associadas a complicações ou extensões de infecções já presentes na admissão, a menos que uma alteração no patógeno ou sintomas sugiram fortemente a aquisição de uma nova infecção na instituição.
 - Infecções em crianças que foram adquiridas por via transplacentária (por exemplo, herpes simplex, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus ou sífilis) e que se tornam evidentes 48 horas após o nascimento.
 - Reativação de uma infecção latente (por exemplo, herpes zóster, herpes simplex, sífilis ou tuberculose).
- Não são consideradas infecções:
 - Colonização, que significa a presença de microrganismos na pele, nas membranas mucosas, nas feridas abertas ou nas excreções ou secreções, mas que não causam sinais ou sintomas clínicos adversos.
 - Inflamação que resulta da resposta do tecido a lesão ou estimulação por agentes não infecciosos, tais como produtos químicos.

A ANVISA, em 2013, publicou o primeiro documento oficial que estabeleceu critérios para diagnóstico das IRAS (ANVISA, 2013a), de modo a harmonizar a identificação do caso e coletar e interpretar as informações de modo sistematizado pelos profissionais e gestores do sistema de saúde, permitindo a vigilância epidemiológica em serviços de saúde de forma mais acertada. Em 2017, os critérios foram revisados e ampliados, com a inclusão de novos critérios diagnósticos (ANVISA, 2017a). Esses documentos apontam categorizações e critérios para diagnóstico das IRAS diferentes em alguns pontos daqueles propostos pelo CDC, sendo esses os critérios a serem adotados por todos os serviços de saúde brasileiros.

Há diversos fatores de risco para aquisição de IRAS. Em países desenvolvidos, os mais importantes são (WHO, 2011a):

- Idade do paciente > 65 anos.
- Admissão em regime de emergência e encaminhamento para UTI.
- Hospitalização superior a sete dias.
- Uso de cateter venoso central, cateter urinário permanente ou tubo endotraqueal.

- Realização de procedimento cirúrgico.
- Estado de imunossupressão.
- Neutropenia (diminuição do número de neutrófilos).
- Ocorrência de doença de rápido curso ou fatal.
- Comprometimento do estado de consciência do paciente ou coma.

Os mesmos fatores de risco são considerados para países de baixa e média rendas, com a adição de outros determinantes que são mais amplamente associados à pobreza, como a falta de saneamento básico e a falta de recursos. Outros fatores de risco para esses países incluem a desnutrição, idade do paciente menor que um ano, baixo peso ao nascer, nutrição parenteral (infusão intravenosa de nutrientes diretamente na circulação sistêmica) ou a presença de duas ou mais doenças subjacentes. Também são fatores de risco os obstáculos gerais às práticas ótimas de controle de infecção em países de baixa e média rendas, devido à falta de apoio financeiro, número inadequado de profissionais da saúde treinados para o controle de infecções e número insuficiente de unidades hospitalares, equipamentos e suprimentos (WHO, 2011a).

2.1.1 O combate às IRAS no Brasil: um breve histórico

As IRAS são reconhecidas pelas autoridades competentes, nacionais e internacionais, como um problema de saúde pública, que necessita de programas eficientes de controle (WHO, 2004; ANVISA, 2013b).

No Brasil, as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) são uma realidade desde a década de 1960. Porém, somente a partir da década de 1980 foram publicados os primeiros marcos legislativos sobre o controle de IRAS, como a Portaria nº 196 de 24 de junho de 1983, que dispõe sobre instruções para o controle e a prevenção das infecções hospitalares (ANVISA, 2013b; BRASIL, 1983). Em 1987 a Portaria nº 232 criou oficialmente o primeiro programa para controle de IRAS, nomeado Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PNCIH) (BRASIL, 1987).

A Lei nº 9.431 de 6 de janeiro de 1997 (BRASIL, 1997) dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de um programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país, sendo conceituado como: conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares. A referida Lei, em seu Art. 2º determina também

que, para a adequada execução de seu programa de controle de infecções hospitalares, os hospitais deverão constituir a CCIH. Posteriormente, a portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, estabeleceu as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares: organização das CCIH, conceitos e critérios diagnósticos, vigilância e indicadores epidemiológicos, lavagem de mãos, além de recomendações gerais (BRASIL, 1998).

Em 1999, foi oficialmente constituída a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, atualmente, é esta agência a 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 (BRASIL, 1999).

Em 2006, a ANVISA, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e com a Coordenação Geral de Laboratórios em Saúde Pública da Secretaria de Vigilância em Saúde (CGLAB/SVS/MS), implementou a Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) (ANVISA, 2008). Seu objetivo principal era o de reduzir a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país, por meio do conhecimento do perfil de resistência dos microrganismos patogênicos e da adoção de medidas de prevenção e controle. A Rede RM monitorava o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos isolados em infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS). Mensalmente, os hospitais cadastrados enviavam dados sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de determinados microrganismos (lista de dez patógenos prioritários). A Rede RM publicou alguns relatórios de atividades, nos quais são apresentados os dados de prevalência de microrganismos para IPCS e a susceptibilidade dos mesmos para diversos antimicrobianos nas diversas regiões brasileiras (ANVISA, 2008).

Em 2010, a ANVISA definiu os indicadores nacionais de infecções a serem monitorados pelos estabelecimentos de saúde brasileiros, considerando aspectos como a simplicidade, o potencial de mortalidade e custos da infecção, a clareza dos critérios diagnósticos e a disponibilidade de medidas conhecidas para a sua prevenção (ANVISA, 2010a). A partir dessa data os indicadores de IPCS em pacientes em uso de cateter venoso central (CVC) passaram a ser de notificação obrigatória no âmbito nacional, para serviços de saúde que possuem unidades de terapia intensiva (UTI), que individualmente ou somadas disponibilizam 10 ou mais leitos. Progressivamente, outros indicadores

de infecções relacionadas à assistência à saúde passariam a ser objetos de vigilância nacional. O documento alerta que a implantação e vigilância desses indicadores podem apresentar resultados efetivos apenas quando aliadas ao desenvolvimento de um programa de prevenção e controle das IRAS. Apesar de não ser ainda de notificação obrigatória, a ANVISA também recomendou a vigilância local de outras infecções: pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), infecção de sítio cirúrgico (ISC) em cirurgia limpa com implante e cesariana e infecção do trato urinário associado a cateter vesical de demora (ANVISA, 2010a). Em 2012, foram disponibilizados novos formulários eletrônicos para a notificação de marcadores de resistência antimicrobiana em IPCS confirmadas laboratorialmente (IPCSL) em UTI adulto, pediátrica ou neonatal o que possibilitou iniciar a vigilância de casos de IRAS por microrganismos resistentes e a implementação nacional de ações para prevenção e controle desses casos dentro dos serviços de saúde (ANVISA, 2014a). A partir de 2014, instituiu-se a notificação obrigatória para os serviços de saúde com UTI com qualquer número de leitos, além da IPCS relacionada ao uso de CVC em UTI, os marcadores de resistência microbiana relacionadas a essas infecções e também as ISC relacionadas ao parto cirúrgico (ANVISA, 2013b; ANVISA, 2014a).

Em 2010, a Nota Técnica nº 1/2010 da ANVISA descreve medidas para identificação, prevenção e controle de IRAS por microrganismos multirresistentes (microrganismos resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos) (ANVISA, 2010b).

Devido à orientação dada pela *World Health Organization* (WHO), sobre a necessidade de priorizar a segurança do paciente, a Portaria nº 529 de 01 de abril de 2013 instituiu o Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP), com o objetivo de contribuir para a qualificação do cuidado em saúde em todos os estabelecimentos de saúde do território nacional. A segurança do paciente foi definida como: redução, a um mínimo aceitável, do risco de dano desnecessário associado ao cuidado de saúde (BRASIL, 2013). Assim, um grande passo é dado em âmbito nacional sobre a prevenção de IRAS, de forma a priorizar o cuidado à saúde do paciente, obedecendo aos critérios da beneficência e da não-maleficência.

Também em 2013, a ANVISA, baseando-se em documento publicado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011a), e com o objetivo de diminuir, em âmbito nacional, a incidência de IRAS, criou o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas

à Assistência a Saúde (PNPCIRAS) (ANVISA, 2013b). Em 2013 esses procedimentos são atualizados incluindo nova metodologia para caracterização da resistência aos carbapenêmicos (ANVISA, 2013c).

Uma nova versão do PNPCIRAS foi elaborada e publicada em 2016. Nessa nova versão foram incluídos, além dos indicadores já existentes, os indicadores de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e de infecção do trato urinário (ITU) associadas à sonda vesical de demora (ANVISA, 2016a). O documento alerta que, embora a notificação obrigatória em âmbito nacional se refira a alguns indicadores, a vigilância e o monitoramento de todos os indicadores pelas CCIRAS são de suma importância para a redução da incidência das IRAS. Para atingir os objetivos específicos colocados nesse novo plano, são determinadas diversas metas para o aumento das notificações das IRAS de notificação obrigatória por parte das instituições de saúde, adotando-se estratégias como a revisão e elaboração de materiais técnicos sobre prevenção e controle de IRAS, a elaboração de um plano nacional para o controle de resistência microbiana em serviços de saúde e a promoção de ações em parceria com as coordenações estaduais, outros órgãos de saúde pública, além de universidades e conselhos profissionais (ANVISA, 2016a).

Assim, desde 2010 a ANVISA recebe notificações eletrônicas sobre os indicadores de notificação obrigatória e publica esses dados em forma de boletins anuais (ANVISA, 2011a; ANVISA, 2011b; ANVISA, 2011c; ANVISA, 2012a; ANVISA, 2012b; ANVISA, 2013d; ANVISA, 2014b; ANVISA, 2014c; ANVISA, 2014d; ANVISA, 2015a; ANVISA, 2015b; ANVISA, 2015c; ANVISA, 2016b; ANVISA, 2016c). O Boletim nº 14 (ANVISA, 2016c), apresenta alguns dados consolidados. Em 2015, o banco de dados nacional contou com as notificações de IPCS associadas à CVC provenientes das UTI de 2.036 hospitais brasileiros. Foi possível verificar, por exemplo, que em 2015 houve um aumento de 20,3% em relação à 2014 na frequência absoluta de hospitais que notificaram IPCS, e quando comparado à 2011 esse aumento foi de 89,6% o que demonstrou um acentuado crescimento do número de hospitais que aderiram à notificação dos dados de IRAS. Outro dado importante foi a redução gradativa de IPCS em UTI adulto ao longo dos anos, mesmo com o aumento do número de hospitais notificantes: redução de 22,9% de 2011 a 2015 e de 6,3% de 2014 para 2015 (ANVISA, 2016c). Ao se comparar esses dados com os resultados apresentados no boletim da Rede RM de 2006 a 2007 (ANVISA, 2008), pode-se observar que os dados puderam ser aprimorados, devido principalmente ao drástico aumento dos hospitais notificantes. Os

resultados obtidos da vigilância de IPCS por CVC em UTI dos hospitais brasileiros demonstram que ações em âmbito nacional para redução das IRAS podem ser efetivas, devendo, portanto, ser continuadas e aprimoradas.

Apesar da publicação desses boletins pela ANVISA ser um avanço, os dados sobre a incidência e prevalência de IRAS ainda são limitados. Até 2017, a única avaliação de amplitude nacional realizada no Brasil havia sido um estudo publicado em 1995 (PRADE *et al.*, 1995), que identificou uma taxa de prevalência de 15,0% de IRAS em 99 hospitais terciários brasileiros, dados de 1994, ou seja, há mais de duas décadas (ANVISA, 2013b; PADOVEZE; FORTALEZA; 2014). Em junho de 2017, Fortaleza e colaboradores publicaram um novo estudo da prevalência de IRAS no Brasil. O estudo contou com os dados de 152 hospitais de cinco macrorregiões brasileiras, referentes ao período de 2011 a 2013. A prevalência de IRAS no Brasil reportada no estudo foi de 10,8% (FORTALEZA *et al.* 2017).

Em 2017, a ANVISA publicou documento com as medidas de prevenção de IRAS, com a principal finalidade de contribuir para a redução da incidência das IRAS em serviços de saúde, a partir da disponibilização das principais medidas preventivas práticas adequadas à realidade brasileira. As medidas apresentadas estão focadas em pneumonia, ITU e ISC (ANVISA, 2017b).

Apesar dos claros avanços no âmbito legislativo, da divulgação de planos de medidas para prevenção de IRAS e seus resultados e da ampla implantação das CCIRAS nos hospitais brasileiros, há ainda escassez de publicações de dados oficiais em âmbito nacional pelos órgãos competentes sobre a incidência e prevalência de IRAS de forma geral, o que permitiria avaliar e acompanhar o real cenário brasileiro.

2.1.2 Dados mundiais sobre as IRAS e estratégias de combate

Um dos conceitos mais importantes no contexto de combate às IRAS é o de vigilância epidemiológica. Segundo a Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990) “entende-se por vigilância epidemiológica um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos”.

A WHO aponta alguns componentes principais que devem estar presentes em um sistema de vigilância (WHO, 2011a): planejamento, implementação, análise dos dados e interpretação, *feedback* local e intervenções dirigidas pela vigilância.

Em 2010, diversas entidades de saúde americanas se uniram para fazer uma convocação à ação, na direção da eliminação das IRAS. Para tal, iniciam pela recordação do conceito de eliminação, tal como definida para outras doenças infecciosas: “é a redução máxima da incidência de infecção causada por um agente específico em uma área geográfica definida como resultado de esforços deliberados; são necessárias medidas para impedir o restabelecimento da transmissão” (CARDO *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos as IRAS são uma causa comum de mortalidade: em 2002 foram registrados 1,7 milhões de casos de IRAS, com 98.987 mortes relacionadas (KLEVENS *et al.*, 2007). Em 2011, o número estimado de casos de IRAS nos Estados Unidos baixou para 721.800, com aproximadamente 75.000 mortes relacionadas; estima-se ainda que mais da metade das IRAS ocorra fora da Unidade de Terapia Intensiva (UTI). As infecções mais comumente reportadas em 2011 foram (em ordem decrescente): pneumonia, infecções do trato gastrointestinal, infecções do trato urinário, infecções primárias de corrente sanguínea e infecções de sítio cirúrgico (MAGILL *et al.*, 2014). Os custos médicos anuais com IRAS para os hospitais nesse país podem chegar a 45 bilhões de dólares (SCOTT, 2009).

Os Estados Unidos realizam a vigilância de IRAS por meio de um sistema chamado *National Healthcare Safety Network* (NHSN). Mais de 17.000 hospitais e outras instituições de cuidado à saúde dos 50 estados americanos (acrescidos de Washington D.C. e Porto Rico), reportam seus dados ao NHSN, alguns de forma obrigatória e outros voluntariamente. Os dados reportados nesse sistema são utilizados para calcular indicadores de IRAS em âmbito nacional, que são amplamente divulgados e podem assim ser utilizados pelos hospitais e instituições de saúde, em âmbito estadual e regional, bem como por agências de saúde públicas, como o CDC (em inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*), para propor e aplicar programas de melhorias com o intuito de prevenir e combater às IRAS (CDC, 2016). O último relatório foi publicado em 2016 e se refere a dados do ano de 2014. Nesse relatório de progresso estão incluídos indicadores nacionais e estaduais de IRAS, consideradas de maior incidência ou preocupação no país e que são alvos de vigilância obrigatória, como as infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) e as

infecções por *Clostridium difficile*.

O relatório mostra dados para diferentes tipos de hospitais ou instituições de saúde e utiliza um índice padronizado de infecção, que permite mensurar o progresso das IRAS ao longo do tempo, uma vez que leva em consideração os índices observados e os esperados (de acordo com um índice base calculado por meio de dados de anos anteriores). O índice é ajustado para alguns parâmetros dependendo a infecção que está em análise (por exemplo, número total de leitos da instituição e idade do paciente), assim, se torna possível a comparação do índice entre diferentes instituições. Para 2014 foi possível obter resultados como: 8% de diminuição nas infecções por *C. difficile* e 13% de diminuição nas bacteremias por MRSA entre 2011 e 2014. Mesmo com resultados favoráveis, o relatório ressalta a importância da intensificação no trabalho de combate às IRAS, uma vez que ainda há nos EUA um paciente a cada 25 com pelo menos uma infecção adquirida durante o curso de sua estadia no hospital. Além disso, há previsão de que se as instituições e os profissionais da saúde estiverem alertas sobre a problemática das IRAS e tomem ações específicas é possível diminuir as taxas para alguns tipos de infecção em até 70% (CDC, 2016).

O CDC tem aumentado as iniciativas de conscientização não só dos profissionais da saúde, para os quais todos os esforços têm sido voltados ao longo de muitos anos, mas também dos pacientes, utilizando o conceito de “empoderamento do paciente”, de forma que o paciente exerça um papel de fiscalizador dos serviços de saúde aos quais tem acesso. Para isso é utilizado um farto material de divulgação, como cartazes e vídeos de esclarecimentos, de fácil acesso e entendimento (por exemplo, o vídeo “Cinco dicas para os pacientes”, disponível em <https://www.cdc.gov/hai/patientsafety/patient-safety.html>, CDC, 2017). Essa estratégia se encaixa dentro das ações para promoção da Segurança do Paciente propostas pelo CDC.

Outro importante relatório publicado pelo CDC, que foi amplamente divulgado e teve muita repercussão nas instituições de saúde, foi o “*Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*”, que trouxe à tona as principais ameaças que os microrganismos multirresistentes oferecem aos serviços de saúde americanos, com repercussões potencialmente graves caso não sejam adotadas as ações necessárias. Em projeções conservadoras, o CDC estima que mais de dois milhões de pessoas nos EUA a cada ano contraem infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, com 23.000 mortes resultantes, pelo menos. Segundo o relatório esse cenário possivelmente

se formou por algumas falhas principais, como: falta de capacidade em âmbito estadual e federal em detectar e responder à ameaça iminente da resistência aos antimicrobianos; falta de uma vigilância internacional sistematizada em relação a essas ameaças; falta de dados sobre o uso de antimicrobianos, tanto no cuidado à saúde humana, como também na agricultura; não cumprimento dos programas que estimulam a prescrição e uso racional dos antimicrobianos nos EUA; falta de uso de forma mais ampla nos EUA de tecnologias moleculares avançadas para detecção dessas ameaças. Os microrganismos reportados como ameaças foram categorizadas em três níveis de risco: preocupante, grave e urgente (CDC, 2013).

Segundo esse mesmo relatório, o custo para a economia dos EUA devido à resistência aos antimicrobianos pode chegar a mais de 20 bilhões de dólares de custos diretos, com custos adicionais à sociedade por perda de produtividade que podem chegar a mais de 35 bilhões de dólares por ano (CDC, 2013).

Hoje o CDC fornece um sistema para rastreamento de IRAS decorrentes de microrganismos resistentes aos antimicrobianos que tem proporcionado o conhecimento de padrões de infecções nos níveis nacional, regional e local, além de fornecer apoio laboratorial. Há quatro ações fundamentais adotadas para combater infecções por microrganismos resistentes nos Estados Unidos: a prevenção da ocorrência de infecções e da propagação de bactérias resistentes, o rastreamento de bactérias resistentes, a melhoria no uso de antimicrobianos disponíveis no mercado e a promoção do desenvolvimento de novos antimicrobianos e de novos testes para o diagnóstico para bactérias resistentes (CDC, 2013).

Todas as iniciativas citadas estão previstas dentro do “Plano de Ação contra as IRAS” (em inglês, *National Action Plan to Prevent Health Care-Associated Infections: Road Map to Elimination*) estabelecido pelo Departamento de Saúde dos Estados Unidos (em inglês, *US Department of Health and Human Services – HHS*) e iniciado no ano de 2009 (HHS, 2013). Com os avanços alcançados, algumas das metas do plano foram revisadas em 2016 e preveem reduções que variam entre 25% e 50% no número das principais infecções monitoradas (HHS, 2017).

No continente europeu, o *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* tem calculado as estimativas de incidências de IRAS por meio de estudos de prevalência pontual, nos quais, em uma data escolhida, são colhidos os dados referentes às IRAS nas instituições de saúde participantes. Em 2011-2012, 29 estados

membros da União Europeia (UE) e do Espaço Econômico Europeu (EEE) e Croácia participaram do primeiro EPP das IRAS e do uso de antimicrobianos em instituições de saúde europeias. Todos os países utilizaram o mesmo protocolo padrão, desenvolvido ao longo de dois anos pelas organizações de saúde da UE, em conjunto com organizações internacionais (ECDC, 2013a).

Os resultados do primeiro estudo de prevalência pontual europeu (ECDC, 2013a; ECDC, 2013b) mostraram que o número de pacientes com pelo menos uma IRAS a cada ano na Europa é de 3,2 milhões. A prevalência de pacientes como pelo menos uma IRAS na Europa foi calculada em 6,0% (variação de 2,3 a 10,8% nos diferentes países). Assim, a cada dia, estima-se que cerca de 80.000 pacientes estejam com pelos menos um tipo de IRAS: um a cada 18 pacientes em hospitais europeus apresenta pelo menos uma infecção relacionada à assistência à saúde. A prevalência de IRAS foi maior em pacientes admitidos em UTI, onde 19,5% dos pacientes tem pelo menos uma IRAS, sendo as mais comuns as infecções de trato respiratório e infecções de corrente sanguínea. Menos da metade (45,9%) dos casos de IRAS foram reportados com resultados microbiológicos laboratoriais. Desses, o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) estava disponível para a maioria dos casos (85,0%). Foi possível estimar também que mais de 400.000 pacientes nos hospitais europeus (um a cada três pacientes), fizeram uso de pelo menos um agente antimicrobiano (ECDC, 2013a; ECDC, 2013b). Os dados apresentados foram disponibilizados para a comunidade em forma de infográficos de fácil acesso, o que auxilia no entendimento da situação atual das IRAS do continente europeu.

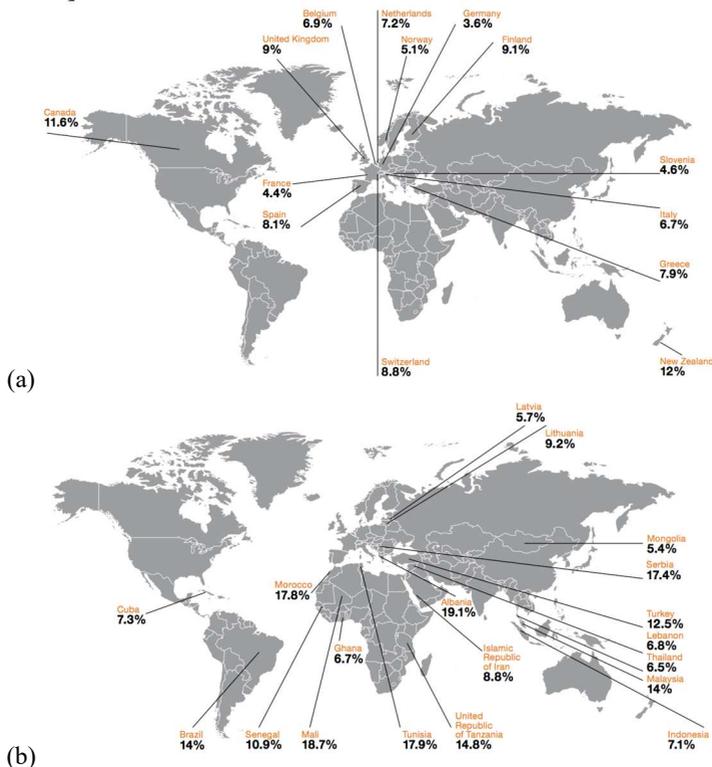
Em 2016 foi publicado o protocolo para a realização do estudo de prevalência pontual 2016-2017, para adequação dos serviços de saúde a mais uma etapa de pesquisa e atualização dos dados. Essa é uma medida que proporciona uma etapa de treinamento às instituições de saúde para a correta coleta de dados, o que possibilitará a criação de um novo mapa europeu sobre as IRAS e a resistência aos antimicrobianos (ECDC, 2016).

A *World Health Organization* (WHO), publicou um importante relatório em 2011, no qual, por meio de revisões sistemáticas da literatura disponível de 1995 a 2010, pôde calcular a prevalência de IRAS em 7,6% para países de renda alta. No relatório, a WHO alerta sobre a escassez de dados sobre os países em desenvolvimento, o que acaba por formar um quadro muito fragmentando, dificultando o entendimento sobre o real cenário das IRAS nesses países. A prevalência de IRAS em países em desenvolvimento, de acordo com os

dados disponíveis, pode variar de 5,7% a 19,1% (Figura 1) (WHO, 2011a). Esse cenário de diferença para os dados de IRAS entre países desenvolvidos e em desenvolvimento foi ressaltado em um artigo publicado pela instituição, também em 2011 (ALLEGIANZI *et al.*, 2011).

O paciente internado nas instituições de saúde desenvolve em média de uma a três IRAS por ano, mais frequentemente infecção do trato urinário e pneumonia. Porém, a infecção de sítio cirúrgico (ISC) é o tipo mais estudado em países de baixa e média rendas, com densidade de incidência que varia de 1,2% a 23,6% por 100 procedimentos cirúrgicos. Por outro lado, as taxas de ISC variam entre 1,2% e 5,2% nos países desenvolvidos (WHO, 2011a).

Figura 1. Prevalência das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em países de renda alta (a) e em países de baixa e média rendas (b) entre 1995 e 2010. Para países com mais de um estudo foi considerado o estudo mais recente.



Fonte: WHO, 2011a.

O risco de adquirir IRAS é significativamente maior em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), com aproximadamente 30% dos pacientes afetados por pelo menos um episódio de IRAS, com morbidade e mortalidade substancial associada. Em países desenvolvidos, a densidade de incidência é de 17,0 episódios de IRAS por 1.000 pacientes/dia, em pacientes adultos de alto risco. Já em países de baixa e média rendas, a incidência de IRAS adquiridas em UTI por pacientes adultos varia de 4,4% a 88,9%, com densidade de incidência de 42,7 episódios de IRAS por 1.000 pacientes/dia. A alta frequência de infecção está associada ao uso de dispositivos invasivos, em particular cateter venoso central, cateter urinário e ventiladores mecânicos. Em UTI adultas, pacientes em países desenvolvidos possuem uma densidade de incidência de infecção de corrente sanguínea associada ao cateter (ICS-AC) de 3,5 por 1.000 cateter/dia, infecção de trato urinário associada ao cateter (ITU-AC) de 4,1 por 1.000 cateter urinário/dia e de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) de 7,9 por 1.000 ventilador/dia. Em países de baixa e média rendas essa densidade de incidência é de 12,2 por 1.000 cateter/dia para ICS-AC, 8,8 por 1.000 cateter urinário/dia para ITU-AC e 23,9 por 1.000 ventilador/dia para PAV. De acordo com alguns dados sobre IRAS associadas a dispositivos em UTI de 25 países da América Latina, Ásia, África e Europa, a mortalidade em adultos foi de 18,5% para ITU-AC, 23,6% para ICS-AC e 29,3% para PAV. Recém-nascidos também são incluídos na população de alto risco para aquisição de IRAS em países em desenvolvimento, sendo que as taxas de infecção neonatal são de três a 20 vezes maiores do que em países desenvolvidos (WHO, 2011a).

Ainda, segundo o mesmo relatório da WHO, o impacto das IRAS implica em (WHO, 2011a):

- estadia prolongada na instituição de saúde;
- afastamento por incapacitação a longo prazo;
- aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos;
- grande encargo financeiro adicional para os sistemas de saúde;
- altos custos para os pacientes e suas famílias;
- excesso de mortes.

Como exemplo, o relatório traz dados sobre o continente europeu, onde as IRAS causam 16 milhões de dias extras de internação, 37.000 mortes associadas e, adicionalmente, contribuem para mais 110.000 mortes por ano. As perdas financeiras anuais na Europa por conta das IRAS são estimadas em cerca de sete milhões de euros, incluindo apenas os custos diretos. A informação é novamente muito escassa para países de baixa e média rendas e não existem dados disponíveis em âmbito

nacional ou regional. Uma revisão de vários estudos mostrou que o aumento do tempo de internação associado às IRAS variou entre cinco e 29,5 dias (WHO, 2011a).

O relatório concluiu que, embora as estimativas globais de IRAS ainda não estejam disponíveis, ao integrar dados de estudos publicados, há evidências claras de que centenas de milhões de pacientes são afetados anualmente em todo o mundo, sendo que o fardo das IRAS é muito maior nos países de baixa e média rendas (WHO, 2011a).

De forma a auxiliar programas para prevenção e controle de IRAS, a WHO publicou em 2011 um documento que propõe ferramentas de fácil acesso e uso, que podem auxiliar a planejar, organizar e implementar esses programas, em âmbito regional e nacional: “*Core components for infection prevention and control programmes – assessment tools for IPC programmes*” (WHO, 2011b). Outros materiais da instituição também colocam de forma clara e precisa diversos conceitos e ações a serem utilizados no combate às IRAS: “*Prevention of hospital-acquired infections – a practical guide*” (WHO, 2002) e “*Practical guidelines for infection control in health care facilities*” (WHO, 2004).

Cardo e colaboradores (2010), em uma convocação à ação, realizada por diversas entidades de saúde americanas, com o objetivo de eliminar as IRAS nos EUA, trazem que o trabalho nesse sentido exigirá ação e vigilância constantes, que devem ser apoiados por investimentos suficientes e pontuam quais são os pilares para a eliminação das IRAS:

- Promover a **adesão a práticas baseadas em evidência**, educando, implementando e realizando investimentos.
- Aumentar a sustentabilidade por meio do alinhamento dos incentivos financeiros e do **reinvestimento em estratégias bem-sucedidas**.
- **Preencher lacunas de conhecimento** para responder a ameaças emergentes por meio de pesquisas básicas, translacionais e epidemiológicas.
- **Coletar dados para direcionar os esforços de prevenção** e mensurar os progressos.

Esses pilares para a eliminação das IRAS são citados no PNPCIRAS 2013-2015, reiterados no PNPCIRAS 2016-2020 e reconhecidos pela ANVISA como imperativos para a eliminação de IRAS no Brasil (ANVISA, 2013b; ANVISA, 2016a).

Assim, pelos dados apresentados e em observância a esses pilares, fica evidente que há necessidade de aprofundar o conhecimento sobre a magnitude do impacto nas IRAS no Brasil. Nesse sentido,

programas institucionais de rastreamento de bactérias associadas às IRAS podem auxiliar no conhecimento da problemática a ser enfrentada, dos padrões de disseminação e dos perfis de resistência. A ampliação desse conhecimento e dos indicadores de IRAS, a exemplo do que ocorre nos EUA e Europa, auxiliará na implementação de recomendações mais direcionadas, sobre a vigilância ativa das IRAS, o uso racional de antimicrobianos e melhor direcionamento de medidas de conscientização voltadas aos profissionais de saúde. Essas ações conjuntas podem auxiliar na proposição de um modelo eficaz de controle da disseminação de IRAS, adequado à realidade brasileira, garantindo uma maior segurança ao paciente e a redução de custos para as instituições de saúde.

2.1.3 Principais IRAS e microrganismos associados

No Brasil, estima-se que a prevalência de IRAS esteja entre 10-14,0% (FORTALEZA *et al.*, 2017; WHO, 2011a), sendo que as infecções mais comuns são pneumonia (3,6%), infecção de corrente sanguínea (ICS, 2,8%), ISC (1,5%) e ITU (1,4%) (FORTALEZA *et al.*, 2017).

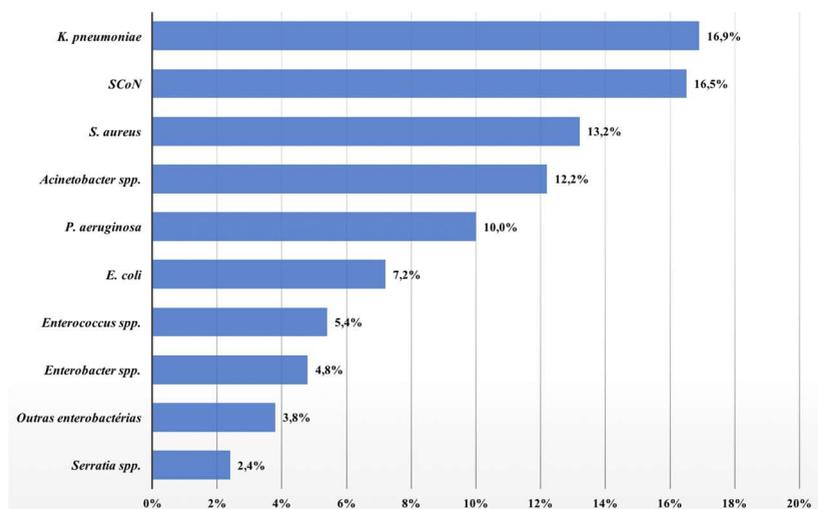
No continente europeu, as IRAS mais reportadas são (em ordem decrescente): pneumonia, infecção do trato respiratório inferior, ISC, ITU, ICS e infecções do trato gastrointestinal. Os microrganismos mais comumente identificados nessas infecções foram: *Escherichia coli* (15,9%), *Staphylococcus aureus* (12,3%), *Enterococcus* spp. (9,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,9%), *Klebsiella* spp. (8,7%), *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (7,5%), *Candida* spp. (6,1%), *Clostridium difficile* (5,4%), *Enterobacter* spp. (4,2%), *Proteus* spp. (3,8%) e *Acinetobacter* spp. (3,6%) (ECDC, 2013b).

No Brasil, os dados oficiais de IRAS em âmbito nacional estão disponíveis apenas para infecção primária de corrente sanguínea (IPCS). Entre 2006 e 2007, os microrganismos mais identificados nas IPCS são do gênero *Staphylococcus*, identificado em 47% de todas as notificações enviadas, seguido pelos isolados de *Klebsiella pneumoniae* (13%), *P. aeruginosa* (12%), *Acinetobacter* spp. (11%), *Enterobacter* spp. (6%), *Enterococcus* spp. (5%), *Candida* spp. (4%) e *E. coli* (3%) (ANVISA, 2008).

Os microrganismos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos das IPCS em UTI adulto no ano de 2015 estão disponíveis na Figura 2 (ANVISA, 2016c). Para UTI pediátricas e

neonatais os microrganismos mais frequentemente notificados são os mesmos, porém com frequências um pouco diferentes. Em relação aos dados de 2006 a 2007 (ANVISA, 2008), as diferenças observadas se deram principalmente ao drástico aumento do número de hospitais notificantes. Foi possível observar também que a distribuição dos microrganismos identificados nas IPCS no Brasil não sofre grande impacto devido às diferentes regiões brasileiras.

Figura 2. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea (IPCS) associada a cateter venoso central (CVC) em pacientes adultos hospitalizados em UTI em 2015 no Brasil.



SCoN: *Staphylococcus spp.* coagulase negativa. Fonte: modificado de ANVISA, 2016c.

Como pode ser constatado pelos dados apresentados, as bactérias tem sido os microrganismos mais associados às IRAS. Rice (2008) alerta sobre um grupo específico de bactérias, que tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, é motivo de grande preocupação. Embora muitas bactérias permaneçam susceptíveis à maioria dos agentes antimicrobianos, o que facilita o tratamento das IRAS, esse pequeno grupo emergiu e escapa da ação de muitos antimicrobianos disponíveis, por isso, foi apelidado de “ESKAPE”: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Os

ESKAPE são de especial importância, não só porque causam a maior parte das IRAS, mas também porque representam paradigmas de patogênese, transmissão e resistência. Rice (2008) salienta que se aprendermos a controlar esses microrganismos, os hospitais serão mais seguros, porque as lições aprendidas podem ser aplicadas a virtualmente qualquer espécie. Infelizmente, os ESKAPE são cada vez mais prevalentes nos hospitais e cada vez mais resistentes a muitos dos agentes antimicrobianos disponíveis (RICE, 2008).

De acordo com dados reportados pelas diversas entidades de saúde nacionais ao redor do mundo, é possível observar que as bactérias Gram-negativas são de especial preocupação para os países em desenvolvimento, principalmente as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, enquanto que para os países desenvolvidos, como os EUA, parece haver maior impacto de algumas bactérias Gram-positivas, especialmente MRSA e mais recentemente *C. difficile* (CDC, 2016; ECDC, 2015; CDC, 2013; ECDC, 2013a; WHO, 2011a). No entanto, todas as entidades de saúde colocam os microrganismos que formam o grupo ESKAPE, como de grande preocupação, principalmente devido à sua habilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos.

2.2 Resistência aos antimicrobianos

Embora muitas das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) possam ser tratadas com certa facilidade, outras podem afetar mais seriamente a saúde do paciente, especialmente quando há envolvimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, o que prolonga o curso da doença e o tempo de internação, diminui as defesas do paciente, aumenta a chance de morte e, em consequência, os custos financeiros e sociais para as instituições de saúde. O acesso a antimicrobianos que sejam efetivos são pré-requisitos tanto para a prevenção como para o tratamento de infecções e, além disso, garante que procedimentos complexos, como cirurgias e tratamentos quimioterápicos, por exemplo, possam ser realizados com baixo risco (WHO, 2015; ECDC, 2013b; SCOTT, 2009; ZIMLICHMAN *et al.* 2013).

A resistência aos antimicrobianos afeta todas as áreas da saúde e tem um impacto em toda a sociedade. A WHO destaca que **sem uma ação imediata e harmonizada em escala global, o mundo está se encaminhando para uma era pós-antimicrobiana, na qual infecções comuns poderiam mais uma vez serem fatais** (WHO, 2015).

A resistência aos antimicrobianos se desenvolve quando um

microrganismo se adapta e cresce na presença dos antimicrobianos. Como muitos antimicrobianos pertencem à mesma classe, a resistência a um antimicrobiano específico pode significar a resistência a toda essa classe. A resistência se desenvolve em um microrganismo localmente e pode se disseminar rapidamente e de forma não previsível, por meio da troca de material genético entre diferentes microrganismos, podendo afetar o tratamento em uma variedade de infecções e doenças. A resistência aos antimicrobianos pode circular nas populações humanas e animais, por meio dos alimentos, água e ambiente, e sua transmissão é influenciada pelo comércio, pelas viagens e pela migração humana e animal (WHO, 2015).

Os antimicrobianos revolucionaram a medicina em muitos aspectos, a sua descoberta foi um ponto de mudança na história da humanidade, seu uso reduziu a mortalidade infantil, aumentou a expectativa de vida, além de ter permitido a realização de diversos procedimentos médicos com mais segurança. Infelizmente, o uso desses fármacos tem sido acompanhado por um rápido aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (BLAIR *et al.*, 2015; WHO, 2015; DAVIES; DAVIES, 2010). Qualquer uso de antimicrobianos, mesmo de forma apropriada, contribui para o desenvolvimento da resistência. No entanto, a pressão de seleção aplicada de forma incessante pelos seres humanos pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, via subutilização, uso excessivo e mau uso tanto na medicina humana, como na veterinária e na produção de alimentos, combinada com a fácil e rápida mobilidade ao redor do mundo e dificuldades em se adotar medidas simples de controle formam o ecossistema perfeito para garantir o desenvolvimento de gerações de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e sua ampla distribuição na biosfera (O'NEILL, 2014; DAVIES; DAVIES, 2010; HAWKEY; JONES, 2009). Em todo o mundo, o uso de antimicrobianos é o fator que mais contribui para a evolução dos mecanismos de resistência. Os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais comumente prescritos e utilizados na medicina humana, porém até 50% de todos os antimicrobianos prescritos para seres humanos não são necessários ou não são plenamente eficazes (CDC, 2013). Outro fator principal que contribui para o crescimento da resistência aos antimicrobianos é a propagação de cepas de bactérias resistentes de pessoa para pessoa ou de fontes não-humanas ambientais, incluindo alimentos, por meio da exposição a culturas tratadas com agentes antimicrobianos ou por águas subterrâneas contaminadas pelo escoamento de áreas de produção agropecuária, por exemplo (WHO, 2015). Nos Estados Unidos, estima-

se que cerca de 70% do total de antimicrobianos sejam consumidos por animais, sendo os 30% restantes utilizados em humanos (O'NEILL, 2015b).

Nesse sentido, a WHO propõe a necessidade de uma abordagem mais efetiva, dentro do conceito de “**Saúde Única**”, que envolve a coordenação entre diversos setores e atores, incluindo a medicina humana e veterinária, a agricultura, o meio-ambiente e consumidores bem informados (WHO, 2015).

O rápido desenvolvimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos combinado à ameaça imediata da redução na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos traz como consequência uma tormenta em relação às IRAS: a falta de opções seguras de tratamento (PELEG; HOOPER, 2010). Quando as opções de tratamento com antimicrobianos de primeira e segunda linhas são limitadas pelas resistências ou não estão disponíveis, restam poucas opções aos profissionais de saúde, que são forçados a utilizar antimicrobianos que podem ser mais tóxicos para o paciente e, frequentemente, mais caros e menos eficazes (WHO, 2015; CDC, 2013).

O termo "superbactéria", utilizado coloquialmente, refere-se às bactérias com maior morbidade e mortalidade, devido aos altos níveis de resistência às diversas classes de antimicrobianos recomendadas para o seu tratamento. Em alguns casos, essas cepas também adquiriram maior virulência e melhoramento dos meios de transmissão (DAVIES; DAVIES, 2010).

De acordo com o proposto por uma iniciativa conjunta entre o CDC e o ECDC para criar uma terminologia internacional padronizada que permite descrever os perfis de resistência adquiridos, as bactérias podem ser classificadas da seguinte forma (MAGIORAKOS *et al.*, 2011):

- Multirresistentes ou MDR (do inglês, *multidrug-resistant*): bactéria não susceptível a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos.
- Extensivamente resistentes ou XDR (do inglês, *extensively drug-resistant*): bactéria não susceptível a pelo menos um agente de todas as classes de antimicrobianos, menos uma ou duas classes (ou seja, a bactéria é sensível somente a uma ou duas classes de antimicrobianos).
- Pan-resistentes ou PDR (do inglês, *pandrug-resistant*): bactérias não susceptíveis a todos os agentes em todas as classes de antimicrobianos.

Um isolado bacteriano é considerado não susceptível a um agente

antimicrobiano quando os testes de susceptibilidade *in vitro* forneceram resultados que permitiram classificar o isolado como resistente, com resistência intermediária ou não susceptíveis a determinado agente antimicrobiano, utilizando os pontos de corte clínicos como critério interpretativo, de acordo com o EUCAST (em inglês, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), CLSI (em inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) e/ou FDA (em inglês, *US Food and Drug Administration*) (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

Apenas a resistência antimicrobiana adquirida foi levada em consideração na criação das definições MDR, XDR e PDR. A resistência intrínseca que alguns microrganismos apresentam não são considerados nessas definições. Há listas fornecidas pelo EUCAST, CLSI e/ou FDA com os microrganismos específicos que são intrinsecamente resistentes a certos agentes antimicrobianos. Esse critério foi adotado para garantir que esses agentes antimicrobianos não seriam levados em conta na aplicação das definições MDR, XDR e PDR (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

Em 2013, um termo de cooperação técnico-científico instituiu o BrCAST (em inglês, *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), um comitê designado conjuntamente pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Dentro dos objetivos do BrCAST estão a determinação e revisão periódica dos pontos de corte para interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos para uso clínico e com finalidade epidemiológica, a busca por um consenso internacional e/ou harmonização com o (EUCAST) e o (CLSI) e a proposição junto à ANVISA da implementação desses pontos de corte revisados nos laboratórios clínicos em todo o Brasil (BrCAST, 2018). Os laboratórios clínicos brasileiros estão em processo de implementação das novas diretrizes advindas do BrCAST.

A resistência aos antimicrobianos e os genes de resistência podem ser conceituados de diversas formas. Martínez, Coque e Baquero (2015) discutem de forma amplificada esses diversos formatos:

Resistência aos antimicrobianos: sob o ponto de vista clínico a resistência se baseia em pontos de corte da concentração inibitória mínima (CIM: menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo), que são fixos, pois apenas a probabilidade de falha terapêutica em pacientes humanos é considerada; sob o ponto de vista epidemiológico é definida como o valor de CIM

que corresponde ao limite superior da população selvagem de uma espécie particular de microrganismo (requer a análise de um alto número de isolados, de forma independente, para definição dos pontos de corte); operacionalmente, esse conceito se baseia na comparação de pares de uma cepa parental com uma cepa mutante ou com uma cepa que contém um gene de resistência que tenha sido adquirido por transferência horizontal - a cepa é considerada resistente se tiver um valor de CIM mais elevado para o antimicrobiano estudado do que a sua cepa parental selvagem, não havendo, portanto, pontos de corte. Esse último conceito é de difícil aplicação na prática clínica, no entanto, é a definição mais relevante para os estudos de genômica e metagenômica da resistência aos antimicrobianos, pois permite aos pesquisadores definir um gene específico, cuja expressão (ou inativação) torna um hospedeiro receptor sensível mais resistente a um determinado antimicrobiano (MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

Genes de resistência: ecologicamente, conferem proteção a um microrganismo do efeito inibitório de um antimicrobiano que é produzido por outro microrganismo e essa definição forma duas categorias de genes de resistência - aqueles que evoluíram naturalmente, para neutralizar a atividade de antimicrobianos naturais que são produzidos por células vizinhas, e aqueles que foram adquiridos por transferência horizontal de genes, desde que se iniciou o uso de antimicrobianos pelos seres humanos. Operacionalmente, um gene de resistência confere resistência a um antimicrobiano quando está presente ou quando ele, por estar ausente, aumenta a susceptibilidade do microrganismo ao antimicrobiano (MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

Os autores colocam ainda a importância em se distinguir a ubiquidade e a abundância de um dado gene de resistência e como esses parâmetros podem se relacionar à sua função. Os genes ubíquos são classificados como genes de resistência que estão provavelmente envolvidos em processos básicos na fisiologia bacteriana, contribuindo para a reprodução do organismo em cada ecossistema; mas, se esses genes representam um risco para a saúde humana, isso é discutível. Em contrapartida, qualquer gene que seja capaz de conferir resistência e que seja mais abundante em habitats com alta concentração de antimicrobianos, como nos ambientes de agropecuária e hospitalares, é mais provável que seja relevante para o desenvolvimento da resistência (MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2015).

2.2.1 Principais antimicrobianos e mecanismos de resistência associados

A resistência intrínseca de algumas espécies de bactérias a um antimicrobiano é a habilidade de resistir à ação desse antimicrobiano como um resultado inerente à sua estrutura ou aspectos funcionais que a caracterizam. Por exemplo, a resistência intrínseca de algumas bactérias Gram-negativas a muitos compostos se dá pela inabilidade desses agentes em atravessar a membrana externa, como a vancomicina, que age muito bem em Gram-positivos, mas não em Gram-negativos, pois não consegue atravessar a membrana externa e acessar os peptídeos periplasmáticos, que são o seu alvo. Diversos genes responsáveis pela resistência intrínseca aos antimicrobianos de diferentes classes, como beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, têm sido identificados e o entendimento sobre a base genética dessas resistências e seu espectro de atividade pode ajudar a guiar o desenvolvimento de novas combinações de antimicrobianos, que podem proporcionar a melhoria e a expansão da atividade desses agentes contra certas espécies de bactérias (BLAIR *et al.*, 2015).

Desde 1940, antimicrobianos para uso humano têm sido fabricados, utilizados clinicamente, liberados no meio ambiente e amplamente disseminados de forma crescente, proporcionando a manutenção constante da pressão de seleção para as cepas resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010).

Uma ampla variedade de mecanismos fisiológicos e bioquímicos podem ser responsáveis pela resistência bacteriana aos antimicrobianos (DAVIES; DAVIES, 2010). Os genes de resistência são comumente associados a elementos genéticos móveis e podem ser transferidos entre bactérias de diferentes filos, ou seja, geneticamente distantes (LEVY; MARSHALL, 2004). A transferência horizontal de genes tem ocorrido ao longo da história evolutiva bacteriana, mas nada pode ser comparado com o fenômeno do desenvolvimento e transferência da resistência aos antimicrobianos ocorrido no último século (DAVIES; DAVIES, 2010). Esse mecanismo, sozinho, foi o que mais acelerou e contribuiu para a ampla dispersão de genes de resistência aos antimicrobianos (HAWKEY; JONES, 2009). Equipado com a maquinaria de transferência adequada, os genes de resistência podem, em princípio, ser adquiridos a partir de qualquer fonte (WELLINGTON *et al.* 2013). A capacidade de transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias ambientais e espécies de bactérias patogênicas relevantes é bem reconhecida e explica o aparecimento de diversos mecanismos de

resistência importantes nas instituições de saúde (HAWKEY, 2015). Genes de resistência podem ser transferidos de uma bactéria para outra por meio de vários mecanismos, tais como transferência horizontal de plasmídeos, transposons de DNA ou bacteriófagos. Transposons são elementos genéticos móveis que podem existir tanto em plasmídeos como integrado dentro de outro transposon ou no cromossomo bacteriano. Os integrons possuem estruturas mais complexas, que contém um sítio para a transferência de genes, cassetes gênicos de resistência e um promotor que permite a expressão dos genes de resistência (ALEKSHUN; LEVY, 2007; LEVY; MARSHALL, 2004). Os plasmídeos são os principais vetores utilizados pela maioria das bactérias, mas especialmente nas Gram-negativas e formam estruturas que são verdadeiros mosaicos de genes de resistência, proporcionando o surgimento e propagação dos fenótipos MDR (BLAIR *et al.*, 2015). Além disso, múltiplos plasmídeos podem existir em uma única bactéria (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Genes cromossômicos também podem ser transferidos por meio da aquisição, pela bactéria, de DNA liberado por outro microrganismo. Na ausência de plasmídeos e transposons podem ocorrer também mutações cromossômicas. Em alguns casos, a expansão de clones de bactérias resistentes e, em outros, a disseminação de plasmídeos, explicam o rápido aumento das taxas de resistência (BLAIR *et al.*, 2015). A complexidade dos processos que contribuem para o surgimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos não pode ser subestimada e a falta da disseminação de conhecimento básico sobre o assunto é uma das principais razões para que se tenha tido pouco êxito na prevenção e controle do desenvolvimento dessas resistências (DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida ou desenvolvida pelas bactérias por diversos mecanismos, que podem ser divididos em três grupos principais (BLAIR *et al.*, 2015; LEVY; MARSHALL, 2004):

- Mecanismos que tem como alvo o transporte do antimicrobiano: minimizam a concentração intracelular do antimicrobiano, por meio da diminuição da permeabilidade celular àquele antimicrobiano ou por efluxo do mesmo. Por exemplo, uma bomba de efluxo ativo medeia a resistência às tetraciclínas e fluoroquinolonas.
- Mecanismos que modificam o alvo do antimicrobiano: mutação genética ou modificação pós-traducional do alvo. Mudanças na estrutura do alvo evitam a ligação do antimicrobiano, mas ainda permite que o alvo realize as suas

funções normalmente, conferindo assim a resistência. Por exemplo, a célula bacteriana pode alterar estruturas do ribossomo e proteínas envolvidas na replicação do DNA, não permitindo que o antimicrobiano iniba funções vitais para a célula bacteriana.

- Mecanismos que inativam o antimicrobiano: a célula bacteriana sintetiza enzimas que podem hidrolisar ou modificar o antimicrobiano. Por exemplo, as enzimas beta-lactamases, que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas.

A Tabela 1 mostra as formas de ação e principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos amplamente utilizados.

Tabela 1. Métodos de ação e mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos.

Classe	Antimicrobiano	Alvo	Mecanismos de resistência
Beta-lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporinas (cefamicina), carbapenêmicos (meropenem), monobactâmicos (aztreonam)	Síntese de peptidoglicano	Hidrólise, bomba de efluxo, alteração alvo
Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomicina, espectinomicina	Tradução	Fosforilação, acetilação, adenilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Síntese de peptidoglicano	Reprogramação da síntese de peptidoglicano
Tetraciclina	Tigeciclina, minociclina	Tradução	Mono-oxigenação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina	Tradução	Hidrólise, glicosilação, fosforilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Lincosamidas	Clindamicina	Tradução	Adenilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Fenicol	Cloranfenicol	Tradução	Acetilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Quinolonas	Ciprofloxacina	Replicação do DNA	Acetilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Pirimidinas	Trimetoprim	Metabolismo C ₁	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C ₁	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Rifamicinas	Rifampicina	Transcrição	ADP-ribosilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Alteração do alvo
Peptídeos catiônicos	Colistina	Membrana celular	Bomba de efluxo, alteração do alvo

Fonte: modificado de DAVIES; DAVIES, 2010.

Peleg e Hooper (2010) ressaltam que as IRAS causadas por bactérias Gram-negativas têm características em relação à resistência aos antimicrobianos que são de especial preocupação: são altamente eficientes na regulação ou aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, especialmente na presença de pressão de seleção; possuem à sua disposição uma infinidade de mecanismos de resistência, muitas vezes usando múltiplos mecanismos contra o mesmo antimicrobiano ou usando um único mecanismo para afetar vários antimicrobianos (PELEG; HOOPER, 2010).

Dentre as classes de antimicrobianos disponíveis para o tratamento de IRAS causadas por bactérias Gram-negativas, os antimicrobianos beta-lactâmicos são os que trouxeram os mais importantes avanços. Esses antimicrobianos atuam na célula bacteriana inibindo enzimas envolvidas na síntese da parede celular, as chamadas PBP (do inglês, *penicillin binding proteins*). Na síntese da parede celular, as unidades glicosídicas NAM (ácido N-acetilmurâmico) e NAG (N-acetilglucosamina) são unidas por uma transglicosidade. Depois, um pentapeptídeo se liga a cada unidade NAM; as PBPs atuam como transpeptidases e catalisam a ligação entre dois pentapeptídeos D-alanina-D-alanina NAM. É essa ligação que confere a rigidez da parede celular. O anel beta-lactâmico é similar à D-alanina-D-alanina NAM. Como resultado, a PBP (transpeptidase) equivocadamente utiliza o anel beta-lactâmico como substrato durante a síntese da parede e esse erro acaba por inativar a PBP de forma irreversível, ativando a autólise, causando a morte celular (BONOMO, 2017; PAPP-WALLACE, *et al.* 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

Dentro dos diversos beta-lactâmicos clinicamente disponíveis, destacam-se as cefalosporinas e os carbapenêmicos. As cefalosporinas são beta-lactâmicos divididos em agentes de primeira, segunda, terceira e quarta geração; essa divisão se baseia em sua data de descobrimento e propriedades antimicrobianas. Em geral, a progressão da primeira para a quarta geração está associada com um aumento do espectro antibacteriano em Gram-negativos, alguma redução na atividade contra Gram-positivos e maior resistência às enzimas beta-lactamases. As cefalosporinas de terceira e quarta geração são consideradas de amplo espectro. Os carbapenêmicos desempenham um papel extremamente importante no arsenal de antimicrobianos disponíveis. Das centenas de diferentes antimicrobianos beta-lactâmicos, os carbapenêmicos possuem o mais amplo espectro de atividade e a maior potência contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Como resultado, eles são muitas

vezes usados como "agentes de última linha" ou "antimicrobianos de último recurso". Infelizmente, o surgimento de bactérias MDR de diversas espécies ameaça seriamente esta classe de medicamentos; a resistência aos carbapenêmicos está aumentando em todo o mundo. Os carbapenêmicos possuem um espectro mais amplo de ação antimicrobiana *in vitro* do que as penicilinas ou do que as combinações disponíveis de cefalosporinas e beta-lactâmicos/inibidores de beta-lactamases. Os mecanismos fundamentais para a resistência aos beta-lactâmicos são (BONOMO, 2017; LEONARD; BONOMO; POWERS, 2013; PAPP-WALLACE, *et al.* 2011; HAWKEY; JONES, 2009; EL-SHABOURY, 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006):

- Hidrólise por beta-lactamases.
- Mudanças nas PBPs.
- Alterações da estrutura e diminuição da expressão de porinas, que resultam em decaimento da permeabilidade aos antimicrobianos através da membrana externa das bactérias.
- A atividade das bombas de efluxo, que diminuem a concentração do antimicrobiano dentro da célula bacteriana.

O mecanismo de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mais importante em bactérias Gram-negativas envolve a produção das beta-lactamases, enzimas periplasmáticas que hidrolisam o anel beta-lactâmico do antimicrobiano, inativando-o, e que estão em rápida evolução, sendo capazes de inativar todas as subclasses de beta-lactâmicos. Antimicrobianos como as penicilinas, cefalosporinas, carpenêmicos e monobactâmicos são hidrolisados por uma ampla gama de enzimas beta-lactamases. A expansão das classes de antimicrobianos utilizadas estimulou o surgimento de uma série de enzimas que ampliaram o seu espectro de atividade. As primeiras beta-lactamases, ativas contra a primeira geração de beta-lactâmicos, foram seguidas das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), com atividade contra as oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira e quarta gerações). As carbapenemases são beta-lactamases com a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos. Como as beta-lactamases se apresentam como uma família de enzimas sujeitas à seleção direta por antimicrobianos, elas parecem ter alterado suas características cinéticas (introdução de aminoácidos em seu sítio ativo), alterando o espectro de substratos sobre os quais podem atuar, de forma que hidrolisam cefalosporinas e carbapenêmicos, os mais potentes agentes terapêuticos beta-lactâmicos. Essa estratégia evolutiva foi acoplada à introdução de novos elementos genéticos que regulam e aumentam a síntese dessas enzimas. A produção de beta-lactamases parece ser a causa mais comum de

resistência aos carbapenêmicos, uma vez que a sua distribuição em diferentes espécies de bactérias é grande. O carreamento conjunto de diversas ESBLs e carbapenemases, como IMP (imipenemase), VIM (Verona integron metallo beta-lactamases) KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), OXA (oxacilinase) e NDM (Nova Deli metallo beta-lactamase), em bactérias Gram-negativas como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* explica o surgimento e disseminação de isolados que são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, com sérias implicações para o tratamento de infecções graves (BLAIR *et al.*, 2015; PALZKILL, 2013; LEONARD; BONOMO; POWERS, 2013; PAPP-WALLACE, *et al.* 2011; HAWKEY; JONES, 2009).

Segundo a classificação molecular de Ambler, as enzimas beta-lactamases podem ser agrupadas em 4 classes estruturais, nomeadas de A a D. Três delas, A, C e D, possuem um sítio ativo contendo serina; a classe B possui 1 ou 2 átomos de zinco em seu sítio ativo e todas as suas representantes são carbapenemases. A classe geneticamente mais diversa é a classe D, com beta-lactamases que podem inativar todo o espectro de antimicrobianos beta-lactâmicos. Um número crescente de carbapenemases da classe A (por exemplo, KPC e GES), da classe B (metalo-beta-lactamases, por exemplo, VIM, IMP e NDM) e da classe D (OXAs) tem sido identificadas. Além disso, a superexpressão de algumas enzimas da classe C (como CMY-10), que não são carbapenemases robustas, pode levar à resistência aos carbapenêmicos, especialmente quando combinada com outros mecanismos de resistência (LEONARD; BONOMO; POWERS, 2013; PAPP-WALLACE, *et al.* 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

O mecanismo mais importante de resistência às cefalosporinas é mediada por diversas beta-lactamases da classe A, que possuem como genes codificadores *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, por exemplo. As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foram adquiridas por transferência horizontal de genes a partir de bactérias ambientais. As ESBLs conferem resistência às penicilinas, às oximino-cefalosporinas, de amplo espectro, e oximino-monobactâmicos, especialmente em Enterobacteriaceae, como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. As ESBLs, no entanto, sofrem inibição por inibidores de beta-lactamases, como sulbactam e tazobactam. SHV foi a primeira ESBL identificada e hoje diversas famílias de ESBL têm sido documentadas, pertencentes à classe A, principalmente, mas também à classe D (como algumas OXAs). Genes codificantes das ESBLs do tipo CTX-M foram transferidos a partir de diferentes espécies do gênero *Kluyvera*, uma bactéria de solo. Essa transferência foi facilitada por sequências de

inserção e transferência de plasmídeos conjugativos. Na década de 1990, as ESBLs mais reportadas eram TEM e SHV, com baixa frequência, além de CTX-M-2 em maior frequência na América do Sul. Desde 2005, a incidência de ESBLs do tipo CTX-M cresceu dramaticamente, sendo disseminada não somente em humanos, mas também em animais e no ambiente. Tipos específicos de CTX-M estão associadas com diferentes regiões geográficas. CTX-M-15 é a mais distribuída no mundo, chegando a níveis endêmicos em muitos países da Ásia, sul da Europa e América do Sul. Baseando-se em análises filogenéticas, sete grandes grupos de *bla*_{CTX-M} foram identificados, em que estão incluídos genes com 95,9-99,7% de identidade: *bla*_{CTX-M-3} (inclui *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-15}), *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14} (incluiu *bla*_{CTX-M-9}), *bla*_{CTX-M-25}, *bla*_{CTX-M-45} e *bla*_{CTX-M-64}. Múltiplos elementos genéticos, como sequências de inserção (IS) e integrons, estão envolvidos na mobilização dos genes *bla*_{CTX-M} do cromossomo bacteriano para plasmídeos conjugativos, que são, por sua vez, responsáveis pela transferência entre as bactérias. Plasmídeos que carregam *bla*_{CTX-M} possuem propriedades de incompatibilidade com alguns hospedeiros, o que explica a elevada prevalência e disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} em Enterobacteriaceae, mas não em *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (BLAIR *et al.*, 2015; HAWKEY, 2015; ZHAO; HU, 2013; WELLINGTON *et al.*, 2013; HAWKEY; JONES, 2009).

Além da resistência às cefalosporinas de amplo espectro, a classe A de beta-lactamases também possui representantes que hidrolisam carbapenêmicos, como as carbapenemases KPC e GES (BLAIR *et al.*, 2015; PAPP-WALLACE, *et al.* 2011). Frequentemente, a resistência aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae é atribuída à expressão mediada por plasmídeo da KPC, considerada endêmica em muitos países. KPC hidrolisa de forma eficiente carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e aztreonam e não é inibida pelos inibidores de beta-lactamases disponíveis clinicamente. O gene *bla*_{KPC} foi mapeado em um transposon altamente conservado, com diferentes isoformas descritas. Plasmídeos que carregam *bla*_{KPC} habitualmente possuem também outros genes que conferem resistência às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, limitando as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por Gram-negativos com KPC. O gene *bla*_{KPC} tem sido raramente mapeado no cromossomo bacteriano. A produção de KPC confere níveis variáveis de resistência aos carbapenêmicos. Análises de isolados com alta resistência aos carbapenêmicos mostraram que essa resistência aumentada pode ter sido causada pelo aumento do número de cópias do gene *bla*_{KPC} ou por perda de porinas específicas (BONOMO, 2017).

As metalo-beta-lactamases (MBLs), pertencentes à classe B, são um grupo diverso de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar quase todos os beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, com exceção dos monobactâmicos. Essa diversidade se dá pela presença de um ou dois átomos de zinco em seu sítio ativo, que altera o mecanismo de ação da enzima. MBLs são codificadas pelos genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{NDM}*, por exemplo. A enzima SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) foi identificada no Brasil em 1997 em um isolado de *P. aeruginosa* e está quase que completamente restrita ao Brasil, tendo sido recentemente descrita também na Europa (HOPKINS *et al.*, 2016; SALABI; TOLEMAN; WEEKS, 2010; TOLEMAN *et al.*, 2002). MBLs foram identificadas há mais de 40 anos, porém não foram consideradas um problema para a antibioticoterapia da época, pelo fato de terem sido encontradas no cromossomo de bactérias não patogênicas. Porém, na década de 1990, ocorreu a disseminação das enzimas IMP e VIM em bactérias Gram-negativas patogênicas, como Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Identificou-se que IMP e VIM eram codificadas em um cassete gênico, acompanhadas de outros genes de resistência em um integron, associado a um transposon que se inseria no cromossomo e também em plasmídeos, permitindo a transferência desses genes para diferentes espécies de bactérias. Essas características proporcionaram a disseminação de genes de MBLs de forma generalizada, auxiliando no aparecimento dos fenótipos MDR. Não há inibidores de metalo-beta-lactamases disponíveis para uso clínico; inibidores como sulbactam ou tazobactam não são efetivos contra essa classe. O surgimento das MBLs com atividade contra os carbapenêmicos comprometeu muito a utilidade clínica dessa classe de antimicrobianos. Alguns países com altas taxas de bactérias produtoras de ESBLs, como a Índia, aumentaram muito a utilização de carbapenêmicos, o que proporcionou uma pressão para a seleção e disseminação de cepas produtoras de carbapenemases. Desde a sua primeira descrição em 2009, a NDM se tornou uma das carbapenemases com o maior poder de disseminação no mundo, sendo responsável por surtos que causam grandes preocupações, devido à ampla resistência e transferência horizontal entre diferentes espécies de bactérias, como *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. NDM confere resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto aztreonam. O gene *bla_{NDM}* não está localizado em integrons, como *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*, porém está associada a sequências de inserção e é encontrado tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídeos, sendo capaz de se movimentar entre os dois com alta frequência (BLAIR *et al.*, 2015; PALZKILL, 2013; HAWKEY; JONES,

2009; TOLEMAN *et al.*, 2002).

A classe C de beta-lactamases, chamadas cefalosporinases, inclui principalmente a AmpC, que foi a primeira enzima bacteriana descoberta que hidrolisava penicilina em *E. coli*, em 1940. A enzima AmpC é estruturalmente similar àquelas da classe A de beta-lactamases, com a diferença que seu sítio ativo é mais aberto, característico de enzimas da classe C, acomodando com habilidade as partes mais volumosas das cadeias de cefalosporinas. AmpC usualmente é codificada por genes localizados no cromossomo bacteriano. No entanto, AmpC presente em plasmídeos tem se tornado prevalentes. Diversos elementos genéticos foram descritos na mobilização de genes AmpC, como sequências de inserção e integrons. Bactérias que expressam AmpC são resistentes às penicilinas, inibidores de beta-lactamases e à maioria das cefalosporinas. As enzimas AmpC não hidrolisam bem cefepime e cefalosporinas de amplo espectro e não conseguem inativar os carbapenêmicos. Essa enzima não está presente no cromossomo de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* e *Salmonella* spp., bem como de outras bactérias. A produção das AmpC em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes, especialmente em Enterobacteriaceae, normalmente é reprimida, porém pode ser induzida por certos tipos de beta-lactâmicos, principalmente cefoxitina e imipenem, assim como sulbactam. Alguns membros da família Enterobacteriaceae, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia* (conhecidas como grupo CESP), apresentam produção aumentada de AmpC, não podendo ser inibidas por ácido clavulânico e sulbactam. Infecções por *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* com superexpressão de AmpC também têm se mostrado clinicamente relevantes. Carbapenêmicos são comumente utilizados para tratar infecções por bactérias produtoras de AmpC, porém a resistência aos carbapenêmicos nesses microrganismos pode emergir, como resultado de perda de porinas e ativação de bombas de efluxo (BONOMO, 2017; JACOBY, 2009).

A classe D de beta-lactamases está relacionada com espécies desafiadoras do ponto de vista clínico. É encontrada principalmente em bactérias Gram-negativas, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *P. mirabilis*. Há mais de 250 subclasses de D beta-lactamases descritas. As variantes de espectro estreito são mais eficazes contra as penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (como ampicilina e cefalotina). As variantes de espectro estendido (ESBLs) representam uma ameaça clínica pois podem hidrolisar as cefalosporinas de terceira e quarta geração (cefotaxima, ceftazidima e cefepima). As carbapenemases de

maior distribuição pertencem à essa classe, conhecidas como CHDL (beta-lactamases de classe D que hidrolisam carbapenêmicos). Apesar de haver um grande número de ESBL e CHDL descritas, as beta-lactamases de classe D ainda não possuem atividade conjunta ESBL+CHDL. Em geral, as beta-lactamases de classe D não são inibidas pelas substâncias com essa função disponíveis no mercado, como ácido clavulânico e sulbactam. Membros da classe D são nomeados utilizando a nomenclatura “OXA” (OXA-1, OXA-2, etc.). Essa convenção surgiu da observação de que as enzimas dessa classe possuíam uma forte atividade hidrolítica contra a penicilina semissintética oxacilina. Conforme um maior número de genes foi descrito, observou-se que muitas enzimas da classe D eram ativas também contra cefalosporinas e carbapenêmicos. Em *A. baumannii* certas beta-lactamases da classe D (como OXA-23, -24, -58, -143) conferem resistência aos carbapenêmicos, enquanto que em *P. aeruginosa*, outras beta-lactamases da classe D (como OXA-14, -28, -35) conferem resistência às cefalosporinas de espectro estendido. A carbapenemase OXA-48, identificada em *K. pneumoniae*, tem causado casos de infecção com maior mortalidade. Em isolados clínicos, genes *bla*_{OXA} têm sido frequentemente encontrados em plasmídeos, incorporados em cassetes de genes em integrons e associadas a sequências de inserção (IS), como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} e *bla*_{OXA-58} (ao contrário da maioria das carbapenemases OXA, cujos genes não estão em integrons em cassetes gênicos e estão, muitas vezes, inseridas no cromossomo bacteriano). As CHDL são agrupadas em subfamílias, de acordo com as sequências de nucleotídeos de seus genes codificantes (LEONARD; BONOMO; POWERS, 2013; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006):

- OXA-23: nomeado também como ARI-1 (*A. baumannii* resistente à imipenem).
- OXA24/40: presente em *A. baumannii*.
- OXA-51: presente em *A. baumannii*.
- OXA-58: presente em *A. baumannii*.
- OXA-143: presente em *A. baumannii*.
- OXA-55: presente em *Shewanella algae*.
- OXA-48, OXA-54: presente em *K. pneumoniae* e *Shewanella oneidensis*, respectivamente.
- OXA-50: presente em *P. aeruginosa*.
- OXA-60: presente em *Ralstonia pickettii*.

A rápida disseminação de diferentes beta-lactamases tem sido extremamente preocupante e limitou as escolhas terapêuticas. O

conhecimento local da epidemiologia e caracterização da resistência tornou-se ainda mais importante quando se considera a terapia empírica (HAWKEY; JONES, 2009).

Além das enzimas beta-lactamases e carbapenemases, a redução da expressão de porinas em Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., tem contribuído de forma significativa para a resistência aos carbapenêmicos e cefalosporinas. Resistências aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae podem ocorrer mesmo na ausência da produção de carbapenemases, devido à presença de mutações em genes que regulam a expressão de porinas, reduzindo a sua expressão, ou mutações em alelos de genes que codificam as porinas, modificando a sua estrutura. A exposição aos carbapenêmicos causou o rápido acúmulo dessas mutações em *E. coli* e *Enterobacter* spp. Isolados de *K. pneumoniae* que expressam variantes de porinas têm sido identificados em linhagens clonais que causam surtos ao redor do mundo. Além do mecanismo de diminuição de porinas, há também o mecanismo de superexpressão de bombas de efluxo. Muitas bombas de efluxo possuem substratos específicos (por exemplo, as bombas Tet), mas outras tem afinidade por uma grande variedade de substratos estruturalmente diferentes, sendo conhecidas como bombas de efluxo multirresistentes. O alto nível de expressão dos genes que codificam as bombas de efluxo sempre se dá por mutações no mecanismo de regulação da expressão gênica. Esse aumento na expressão também pode ocorrer como um resultado da indução da resposta a sinais ambientais e em condições que a função das bombas de efluxo é requerida. Apesar de todas as bactérias carregarem múltiplos genes que codificam bombas de efluxo MDR em seu cromossomo, alguns foram mobilizados e são carregados por plasmídeos, um desenvolvimento preocupante, uma vez que mostra que este mecanismo de resistência pode ser transferido e rapidamente disseminado para outras bactérias clinicamente relevantes. Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão entre as bactérias que comumente superexpressam genes codificantes para bombas de efluxo (BLAIR *et al.*, 2015).

Mutações na proteína PBP ou diminuição em sua transcrição também têm resultado em fenótipos de resistência aos carbapenêmicos. Esse fenômeno pode ser evidenciado em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *P. mirabilis*, por exemplo. Substituições de aminoácidos nas PBPs ou aquisição de uma nova PBP podem causar resistência aos carbapenêmicos em *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *P. mirabilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, por exemplo (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

Vários outros agentes antimicrobianos têm sido utilizados para

tratar infecções por Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos, como TSAs, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, além de várias combinações terapêuticas. No entanto, essa prática tem aumentado o nível de resistência a esses antimicrobianos.

As fluoroquinolonas interagem com a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas que regulam mudanças de conformação do DNA bacteriano durante o processo de replicação e transcrição. A resistência às fluoroquinolonas surgiu por meio de mutações nas regiões codificantes das subunidades da girase (*gyrA* e *gyrB*) e na topoisomerase IV (*parC*). O acúmulo de mutações nesses genes aumentou o nível de resistência às fluoroquinolonas de forma gradativa. Mais recentemente um mecanismo mediado por plasmídeo, com genes *qnr*, que protege o DNA da ligação com a quinolona, tornou-se uma grande preocupação devido à sua frequente associação com as enzimas CTX-M, que inativam cefalosporinas de terceira geração. Adicionalmente, o plasmídeo codificante da enzima aminoglicosídeo acetiltransferase (AAC-61-Ib-cr) degrada fluoroquinolonas com motivo piperazinil (por exemplo, ciprofloxacina e norfloxacina). Essa enzima é uma variante da AAC-61-Ib, que degrada aminoglicosídeos (HAWKEY; JONES, 2009).

No entanto, na história recente da resistência aos antimicrobianos, um dos casos mais dramáticos ocorre com as TSAs. A frequência de infecções por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* MDR, XDR e PDR tem aumentado no mundo inteiro. Diante desse cenário, as TSAs (colistina ou polimixina E e polimixina B), foram reintroduzidas no arsenal terapêutico como antimicrobianos de última escolha. As polimixinas são fármacos antigos, com nefrotoxicidade significativa e por isso seu uso em humanos foi limitado por muito tempo. A colistina, em especial, é comumente utilizada na agricultura em muitos países para controle de infecções e também como promotor de crescimento animal. Esse cenário fez com que a resistência às polimixinas aumentasse em várias partes do mundo, deixando médicos sem opções para o tratamento de infecções bacterianas graves. A resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas se dá principalmente por uma modificação pós-traducional no lipídeo A das moléculas de lipopolissacarídeo (LPS), que formam a membrana externa bacteriana, por diversas mutações cromossômicas. Alterações no LPS impedem a ligação da polimixina à superfície da célula bacteriana, impedindo sua penetração. As taxas de resistência às polimixinas ainda são baixas em diversos países, porém em outros, como Grécia, Itália e China, têm aumentado drasticamente. As taxas de resistência às

polimixinas são maiores em bactérias ESBL e resistentes aos carbapenêmicos. Isso provavelmente se deu pela pressão seletiva, devido ao uso de polimixinas no tratamento de *K. pneumoniae* (positivas para o gene *bla_{KPC}*), e *A. baumannii* (positiva para *bla_{OXA-23}*) resistentes aos carbapenêmicos, além de bactérias carreadores de *bla_{NDM}*, por exemplo. Mecanismos de resistência envolvendo bombas de efluxo também têm sido reportados na resistência às polimixinas. Porém, todos os mecanismos de resistência, até então, estavam conectados a mutações cromossômicas, sem possibilidade de transferência horizontal. No entanto, um novo mecanismo de resistência à polimixina identificado em 2015 em isolados de Enterobacteriaceae de humanos, animais e do ambiente pode piorar muito esse cenário: o gene *mcr-1*, que é carregado por plasmídeo. A prevalência de cepas resistentes em animais é muito maior, chegando a 20% na China, enquanto que em humanos essa prevalência é de 1%. O mecanismo possui facilidade de disseminação - o gene já foi identificado em diversas espécies de relevância clínica e em países de todos os continentes, incluindo o Brasil (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; FERNANDES *et al.*, 2016; BARON *et al.*, 2016; CANIAUX *et al.*, 2017).

2.2.2 Principais bactérias resistentes associadas às IRAS

Dentre todos os problemas de resistência bacteriana e seu impacto nas IRAS, as bactérias Gram-negativas são particularmente preocupantes, porque elas estão se tornando resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis para o tratamento. Isso é verdadeiro também para as bactérias Gram-positivas, porém não na mesma extensão (CDC, 2013; PELEG; HOOPER, 2010). As economias emergentes são fortes usuários de antimicrobianos tanto na medicina como na agricultura, o que, combinado com as deficiências estruturais do sistema de saúde pública, resulta em taxas muito altas de resistência aos antimicrobianos, especialmente entre as bactérias Gram-negativas (HAWKEY, 2015). O reservatório mais importante de bactérias Gram-negativas multirresistentes é o intestino do homem e dos animais, particularmente naqueles que estão recebendo antimicrobianos. A contaminação da água, dos alimentos e do ambiente com esse grupo de bactérias é uma via importante para a sua disseminação, sendo, portanto, uma área crucial para o seu controle (WELLINGTON *et al.*, 2013).

Os bacilos Gram-negativos (BGN) mais comuns nas IRAS são da família Enterobacteriaceae (especialmente *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e

E. coli), *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Todas possuem potencial para serem bactérias multirresistentes, porém com grau de virulência diferenciado (HAWKEY, 2015; CDC, 2013).

A WHO reporta como as bactérias que mais comumente causam infecções relacionadas à assistência à saúde e também na comunidade ao redor do mundo (WHO, 2014):

- *E. coli* resistente às cefalosporinas de terceira geração e às fluoroquinolonas, principalmente em ITU e ICS.
- *K. pneumoniae* resistente às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos, principalmente em pneumonia, ICS e ITU.
- MRSA em infecções de pele e ICS.

As altas proporções de resistência às cefalosporinas de terceira geração relatadas para *E. coli* e *K. pneumoniae* demonstram que o tratamento de infecções severas causadas por essas bactérias depende de carbapenêmicos, antimicrobianos de última linha, que são mais caros e que também acelerarão o desenvolvimento da resistência. *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi identificada na maioria dos países, com proporções de resistência de até 54%. Para *E. coli*, a alta resistência relatada a fluoroquinolonas significa que há limitações para o tratamento oral em infecções comuns na comunidade, como ITU. As altas taxas de MRSA demonstram que o tratamento de infecções graves causadas por *S. aureus*, como infecções comuns da pele e de feridas, depende de antimicrobianos de segunda linha em muitos países e que a profilaxia padrão com antimicrobianos de primeira linha para cirurgia ortopédica e outros procedimentos terão um efeito limitado em muitas instituições de saúde. Os antimicrobianos de segunda linha para tratamento de *S. aureus* são mais caros e têm efeitos secundários severos, necessitando de acompanhamento durante o tratamento, o que aumenta os custos ainda mais. As grandes lacunas no conhecimento da situação dos microrganismos resistentes em muitas partes do mundo aumentam ainda mais a preocupação em relação a esses dados (WHO, 2014).

Os EUA vêm intensificando a vigilância e combate de forma mais específica a alguns microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Em 2013, o CDC publicou um documento que trata sobre as principais ameaças de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (CDC, 2013). Apesar do documento ser baseado em dados da população americana, a comunidade científica e autoridades de saúde mundiais devem ficar atentas aos dados fornecidos pela entidade. As principais ameaças foram avaliadas de acordo com sete fatores associados às

infecções por microrganismos resistentes: o impacto clínico, o impacto econômico, a incidência, a projeção de 10 anos de incidência, a transmissibilidade, a disponibilidade de antimicrobianos eficazes e as barreiras à prevenção. As ameaças foram categorizadas em três níveis de risco (CDC, 2013):

- Urgente: ameaças que podem ter consequências muito graves, devido aos riscos significativos identificados de acordo com vários dos critérios adotados. Estas ameaças podem não estar disseminadas de forma ampla ainda, mas têm esse potencial e exigem uma atenção urgente da saúde pública, com o intuito de identificar infecções e limitar a transmissão.
- Grave: ameaças que podem ter graves consequências. Por razões variadas (por exemplo, incidência ainda baixa ou decrescente ou disponibilidade ainda razoável de opções terapêuticas), não são consideradas ameaças urgentes, mas tem o potencial de piorar e podem se tornar ameaças urgentes se ações de saúde pública para monitoramento e prevenção não forem realizadas.
- Preocupante: estas são bactérias para as quais a ameaça de resistência aos antimicrobianos é baixa e/ou há ainda múltiplas opções terapêuticas para infecções resistentes. Estes agentes patogênicos causam doenças graves. As ameaças nesta categoria requerem monitoramento e resposta rápida em casos de incidentes graves ou surtos.

Algumas das ameaças identificadas pelo CDC, que também são uma preocupação no cenário tanto de países desenvolvidos como em desenvolvimento são apresentadas a seguir (CDC, 2013):

Ameaças Urgentes:

- *Clostridium difficile*: estima-se que nos EUA ocorram 250.000 infecções por *C. difficile* por ano, com 14.000 mortes associadas e pelo menos 1 bilhão de dólares em custos médicos adicionais por ano.
- Enterobacteriaceae resistente aos carbapenêmicos (CRE): cerca de 9.300 IRAS são causadas por CRE a cada ano nos EUA. As CRE mais comuns são *Klebsiella* spp. e *E. coli*.

Ameaças Graves:

- *Acinetobacter* spp. multirresistentes: estima-se que ocorram cerca de 12.000 infecções por *Acinetobacter* spp. ao ano nos EUA, sendo aproximadamente 7.000 (63%) por cepas MDR, com 500 mortes associadas por ano.

- Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs): pacientes com infecção de corrente sanguínea causadas por Enterobacteriaceae ESBL tem 57% mais chance de morrer do que aqueles com infecções não causadas por bactérias ESBL. Os EUA estimam que ao ano ocorram 26.000 infecções por Enterobacteriaceae ESBL, com 1.700 mortes associadas.
- *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: nos EUA, a cada ano, ocorrem cerca de 6.700 casos de infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, com 400 mortes associadas.
- *Enterococcus* spp. resistentes à Vancomicina (VRE): cerca de 30% das infecções por *Enterococcus* spp. são resistentes à vancomicina (20.000 casos/ano), com 1.300 mortes associadas.
- *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA): nos EUA, o MRSA é uma das causas mais comuns de IRAS, estima-se que nos EUA ocorram mais de 80.000 infecções severas, com mais de 11.000 mortes associadas.

Ameaças Preocupantes:

- *Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina (VRSA): os casos de VRSA ainda são raros, mas vem sendo identificados nos EUA desde 2002.

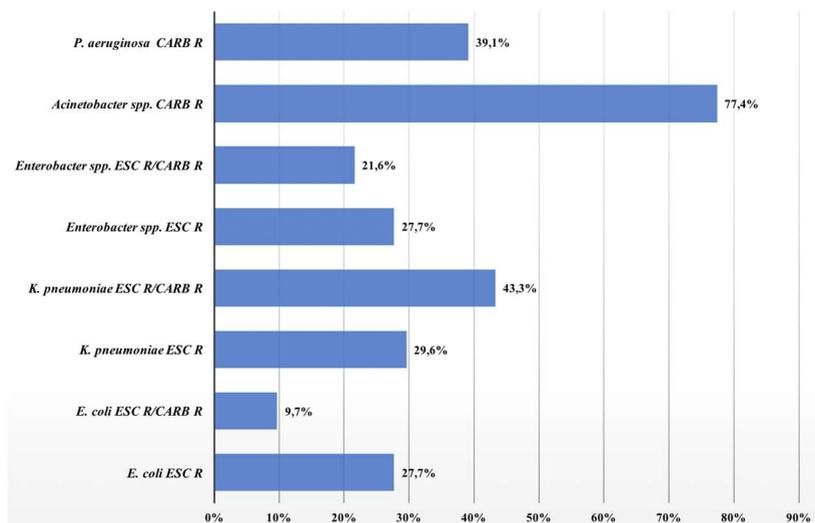
Na Europa, observa-se uma alta resistência aos carbapenêmicos para *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp. A resistência às cefalosporinas de terceira geração também é alta para *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *E. coli*. Entre os Gram-positivos, destaca-se o MRSA, notificado em mais de 40% das infecções por *S. aureus*. Cerca de 33% dos pacientes atendidos em hospitais Europeus receberam pelo menos um agente antimicrobiano para tratamento, desses 71% recebeu um agente, 23% receberam dois e 6% receberam três ou mais agentes antimicrobianos. A maioria (68%) foi para tratamento de infecções, tanto adquiridas na comunidade (maioria) como adquiridas nas instituições de saúde, além do uso profilático, tanto em tratamentos médicos como em pré-operatórios (ECDC, 2013a).

Outro dado europeu interessante diz respeito ao consumo de antimicrobianos pelas instituições de saúde e pela comunidade. O consumo de antimicrobianos para uso sistêmico na comunidade (isto é, fora dos hospitais) variou de 11,3 DDD (dose diária definida) por 1.000 habitantes e por dia, na Holanda, a 31,9 DDD/1.000hab./dia, na Grécia. O consumo médio foi de 21,5 DDD/1.000hab./dia. As penicilinas foram os antimicrobianos mais frequentemente prescritos em todos os países, variando de 30,1% na Alemanha a 67,3% na Eslovênia, enquanto a

proporção de consumo de outras classes de antimicrobianos variou amplamente entre os países: cefalosporinas e outros beta-lactâmicos, de 0,2% na Dinamarca a 23,5% em Malta; quinolonas, de 2,1% no Reino Unido a 13,9% na Hungria. Comparativamente, o consumo de antimicrobianos para uso sistêmico nas instituições de saúde variou de 1,0 DDD/1.000hab./dia na Holanda a 2,8 DDD/1.000hab./dia na Finlândia. O consumo médio dessa população das instituições de saúde foi de 2,0 DDD/1.000hab./dia. O consumo de várias classes de antimicrobianos no setor hospitalar também variou amplamente entre os países. Em contraste com as práticas de prescrição na comunidade, as penicilinas não foram o grupo de antimicrobianos mais frequentemente prescritos. No setor hospitalar, registraram-se variações substanciais: o consumo de cefalosporinas e outros beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, variou de 9,3% na Irlanda a 57,4% na Bulgária; o consumo de quinolonas variou de 6,0% em Portugal a 18,1% na Itália. Assim, a maior proporção de consumo de antimicrobianos ocorre na comunidade (fora das instituições de saúde). Em cerca de 3/4 dos países participantes do relatório, apenas três ou menos agentes antimicrobianos representaram metade do consumo nacional na comunidade. Dados nacionais confiáveis sobre o consumo de antimicrobianos são fundamentais para a compreensão da epidemiologia da resistência aos antimicrobianos, pois fornecem informações importantes sobre a pressão de seleção ecológica devido ao seu uso. Os países que relatam um consumo elevado têm geralmente um nível mais elevado de resistência aos antimicrobianos do que os países que relatam um baixo consumo (ECDC, 2015).

No Brasil, dados do Boletim nº 14 da ANVISA mostram que entre os BGN identificados nas IPCS-AC foram constatadas altas taxas de resistência aos carbapenêmicos no ano de 2015, assim como nos anos anteriores (Figura 6). Nos BGN não fermentadores, a resistência aos carbapenêmicos foi reportada em 77,4% para *Acinetobacter* spp. e em 39,1% para *P. aeruginosa*. Nos BGN pertencentes à família Enterobacteriaceae, as taxas de resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de espectro estendido (terceira e/ou quarta gerações) foi de 43,3% para *K. pneumoniae*, 21,6% para *Enterobacter* spp. e 9,7% para *E. coli* (ANVISA, 2016c).

Figura 3. Porcentagens dos fenótipos de resistência entre os bacilos Gram-negativos (BGN) mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea associada a cateter venoso central (IPCS-AC) em pacientes adultos hospitalizados em UTI em 2015 no Brasil.



Fonte: modificado de ANVISA, 2016c.

Segundo Rossi (2011), o Brasil tem grandes desafios para detectar e controlar a resistência aos antimicrobianos, sendo importante a ação multidisciplinar e a adoção novas políticas de saúde pública com o objetivo de minimizar os efeitos da situação atual.

Em 2010, a Nota Técnica N° 1/2010 da ANVISA descreve medidas para identificação, prevenção e controle de IRAS por microrganismos multirresistentes (ANVISA, 2010b). É destacada a vigilância aos *Enterococcus* spp. resistentes aos Glicopeptídeos, *Staphylococcus* spp. resistentes ou com sensibilidade intermediária à vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (entapetem, meropenem ou imipenem). Ressalta-se o papel da Administração dos Serviços de Saúde, de forma a prover meios técnicos, financeiros, administrativos, laboratoriais e recursos humanos para a apropriada identificação, prevenção e interrupção da transmissão de microrganismos multirresistentes e também as responsabilidades da CCIRAS (ANVISA, 2010b).

Dados da ANVISA e de diversos estudos brasileiros permitem verificar que os BGN resistentes aos carbapenêmicos (Enterobacteriaceae principalmente, mas também *A. baumannii* e *P. aeruginosa*) são hoje a maior fonte de preocupação para as instituições de saúde, uma vez que muitas cepas são multirresistentes (MDR) e, em

alguns casos, chegam a apresentar resistência a todas as classes de antimicrobianos, praticamente anulando as opções de tratamento. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, essas bactérias, caso fossem classificadas conforme os critérios do CDC, não necessariamente receberiam o mesmo nível de risco que receberam no cenário americano. Essas bactérias possivelmente seriam classificadas como ameaças urgentes no Brasil. Muitos hospitais brasileiros veem a guerra contra os BGN MDR como perda: um quadro inaceitável, porém real. Microrganismos Gram-positivos, como o MRSA, são de menor incidência em países em desenvolvimento, como o Brasil, no entanto causam grande preocupação e possivelmente também seriam classificadas como ameaças graves.

A WHO em 2015 lançou o plano “Resistência aos Antimicrobianos - Plano de Ação Global”, com objetivos que visam melhorar a conscientização e a compreensão sobre a resistência aos antimicrobianos, reforçar evidências por meio da vigilância e da pesquisa científica e aumentar o investimento em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções. Para cumprir com esses objetivos, planos nacionais devem ser elaborados e regidos por princípios como o de “Saúde Única” (a resistência aos antimicrobianos irá afetar setores que vão além da saúde humana, assim todos os setores deverão estar envolvidos na implementação do plano de ação) (WHO, 2015).

De forma a assessorar os países na construção do plano de ação nacional, a WHO publicou em 2016 o “Resistência aos antimicrobianos - Manual para desenvolvimento de planos de ação nacional”, com uma série de ferramentas de suporte, como exemplos de mecanismos de coordenação, um modelo genérico para um plano de ação nacional, um exemplo de plano para monitorização e avaliação, além de uma lista simples de tarefas (WHO, 2016). Em 2017, a instituição aguarda que os Estados Membros possam apresentar os planos de ação nacionais para o combate à resistência aos antimicrobianos.

2.3 O papel do ambiente e dos profissionais da instituição de saúde nas IRAS

Há diversas evidências de que o ambiente hospitalar e os profissionais da saúde possuem um papel importante na disseminação de bactérias MDR, podendo se constituir, assim, em peças-chaves na transmissão de IRAS (Figura 7) (OTTER *et al.*, 2013a; GAUDART *et al.* 2013; WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013; ALLEGIANZI;

SAX; PITTET, 2013; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2012; WARNES; HIGHMORE; KEEVIL, 2012; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011; ALLEGRANZI; PITTET, 2009; KRAMER, SCHWEBKE; KAMPF, 2006; HOTA, 2004). Segundo Weber e colaboradores (2013) embora a transferência de patógenos de um paciente colonizado ou infectado para um paciente susceptível ocorra com maior frequência por meio das mãos dos profissionais de saúde, as superfícies hospitalares e equipamentos médicos contaminados (e menos comumente água e ar) podem estar direta ou indiretamente envolvidos na transmissão, de acordo com algumas evidências (WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013):

- As superfícies de leitos de pacientes colonizados ou infectados estão frequentemente contaminadas com os patógenos causadores.
- Os patógenos são capazes de sobreviver em superfícies de leitos de hospital e de equipamentos médico-hospitalares por um longo período de tempo. Por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE), *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. são capazes de sobreviver durante dias ou semanas em superfícies abióticas, enquanto que os esporos de *C. difficile* podem sobreviver em superfícies do ambiente hospitalar durante meses.
- O contato dos profissionais da saúde com as superfícies dos leitos ou equipamentos médico-hospitalares leva à contaminação de mãos e/ou luvas.
- A frequência da contaminação das superfícies dos leitos se correlaciona com a frequência da contaminação de mãos e/ou luvas dos profissionais da saúde.
- Tem se demonstrado que surtos envolvendo cepas de patógenos clones, que contaminam superfícies de quartos e pacientes, se dão pela transmissão pessoa-pessoa ou por compartilhamento de equipamentos médico-hospitalares.
- Pacientes admitidos em um leito ocupado previamente por um paciente que estava colonizado ou infectado por um patógeno tem uma maior chance de desenvolver colonização ou infecção por esse mesmo patógeno.
- A higienização terminal realizada de forma adequada em leitos leva a uma diminuição das taxas de IRAS em pacientes admitidos nesses mesmos leitos, quando os ocupantes anteriores apresentavam infecção ou colonização por patógeno.
- A higienização terminal realizada de forma adequada em leitos leva a uma diminuição global das taxas de IRAS.

Figura 4. Principais rotas de transmissão de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no ambiente hospitalar.



MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; VRE: *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina. BGN: bacilos Gram-negativos. Fonte: modificado de OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011.

Clostridium difficile, MRSA, VRE e bacilos Gram-negativos MDR, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, compartilham a capacidade de sobreviver em superfícies secas por longos períodos após serem dispersos por pacientes infectados ou colonizados e são de difícil erradicação por meio de limpeza e desinfecção. Pacientes colonizados ou infectados por patógenos são a fonte de contaminação primária, assim, superfícies próximas aos pacientes que são tocadas frequentemente pelos profissionais da saúde e pelo próprio paciente, denominadas “superfícies de alto contato”, possuem uma taxa de contaminação maior do que outras superfícies. Essas superfícies de alto contato são, por exemplo, grades de cama, a superfície da cama, equipamentos como bomba de infusão e respirador, carros para guarda e preparo de medicação, etc. Apesar da presença de um patógeno em uma superfície não necessariamente representar um evento de transmissão de IRAS, cargas microbiológicas consideradas infecciosas para a maioria dos patógenos associados ao ambiente nosocomial parecem ser baixas, aumentando assim esse risco de transmissão, e em muitos casos, esse risco pode se igualar àquele observado no contato pessoa-pessoa. Patógenos podem ser adquiridos pelas mãos dos profissionais da saúde por meio do contato com as superfícies ambientais, na ausência de

contato direto com o paciente. Assim, a presença de um patógeno em uma superfície em qualquer concentração é considerada um risco de transmissão (OTTER *et al.*, 2013a; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011; HUSLAGE *et al.*, 2010; HOTA, 2004).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para investigar o papel do ambiente na transmissão de microrganismos relacionados às IRAS, como (OTTER *et al.*, 2013a):

- Modelagem da transmissão: utilização de marcadores não microbiológicos, modelos animais e modelagem matemática.
- Estudos em microbiologia: amostragem ambiental das superfícies de alto contato ao redor do paciente em hospitais e para avaliação da limpeza concorrente e terminal. Estudos *in vitro* que avaliam disseminação de DNA ou outros marcadores, estudo de organismos ou patógenos-modelo.
- Estudos epidemiológicos observacionais: por exemplo, avaliação de risco de um paciente se colonizar por um patógeno que infectava ou colonizava o paciente que ocupava o quarto previamente e rastreamento de rotina para pacientes e ambiente, de forma a buscar as correlações.
- Estudos intervencionais: estudos que se baseiam na evidência de que a limpeza e a desinfecção terminal podem reduzir a chance de infecção para o próximo paciente. Por exemplo, utilização de dispositivos que mostram aos profissionais da saúde níveis de contaminação de superfícies, como ferramenta educativa, e acompanhamento das taxas de infecção por determinados microrganismos antes e após essas medidas tomadas.
- Relatos de surtos: os achados derivados de estudo de surtos são frequentemente limitados, devido à falta de controles e intervenções, por exemplo. Porém, muitos relatos de surtos envolvem superfícies contaminadas na disseminação de diversos patógenos, com o descobrimento de repositórios em equipamentos, móveis e utensílios, por exemplo, que após serem eliminados resultaram na contenção do surto.

Gaudart e colaboradores (2013) conduziram um estudo para testar a hipótese de que a avaliação efetiva da variabilidade espacial (distante e à beira do leito) da contaminação microbiológica poderia facilitar a escolha de intervenções para o controle de IRAS, direcionadas para reduzir o papel do ambiente como uma fonte intermediária de transmissão cruzada. O procedimento de triagem incluiu 24 locais de amostragem diferentes, oito em uma unidade de terapia intensiva médica e 16 em uma unidade de terapia intensiva cirúrgica. Foram amostradas

superfícies próximas e distantes da cama do paciente (não necessariamente ocupados). A amostragem incluiu superfícies em três alturas diferentes, além de amostras de ar. Os resultados mostraram que, apesar das relações de contaminação serem complexas, alguns padrões foram identificados e poderiam ser modelados e utilizados para estimar a distribuição da contaminação microbiana. A ocupação dos leitos e a gravidade da doença do paciente ocupante foram preditores consistentes de contaminação. As contaminações do ar e das superfícies foram mais elevadas na UTI médica, onde os pacientes são de internação mais prolongada e necessitam de mais cuidados, existindo uma interação substancial com o ambiente da beira do leito e particularmente com parentes (visitação é regular e prolongada). Pacientes da UTI cirúrgica geralmente são de internação mais curta, ventilados, requerem suporte mais intensificado dos profissionais de saúde, com período de visitação e número de visitantes limitados (interação de forma mais limitada devido ao estado de saúde do paciente). Os resultados obtidos comprovaram a necessidade do monitoramento ambiental contínuo e não apenas em resposta a surtos. O monitoramento contínuo, segundo os autores, permite o conhecimento de dados das unidades hospitalares, que podem ser utilizados para orientar intervenções. A amostragem contínua também permitiria a identificação de superfícies que estão ligadas a níveis mais elevados de contaminação, onde uma solução estrutural poderia ser procurada. Os autores concluíram, ainda, que é importante não só avaliar os pontos críticos de contaminação dentro de espaços como os leitos de pacientes, mas também avaliar de forma mais global quais são os riscos que podem estar presentes na unidade como um todo e que esses dados poderiam ser utilizados para *benchmarking* (termo em inglês que significa o processo de busca por melhores práticas ou o processo de comparação de desempenho entre sistemas) (GAURDART *et al.*, 2013).

Em 2011, pesquisadores brasileiros publicaram um trabalho com o objetivo de avaliar, por meio de procedimentos multidisciplinares, a conformidade dos procedimentos de precaução de contato, realizados pelos profissionais da saúde, e das recomendações de limpeza e desinfecção do ambiente e equipamentos médico-hospitalares, com a monitorização das taxas de VRE. O estudo foi conduzido por três anos, com um período pré-intervenção, período de intervenção e pós-intervenção. Foram realizados questionários, palestras e um programa de observação dos profissionais da saúde, monitoramento do consumo de antimicrobianos, além de coleta de material para cultura bacteriana de VRE em pacientes, ambiente e equipamentos médico-hospitalares. Os

resultados mostraram uma maior contaminação por VRE nas áreas adjacentes ao paciente e em superfícies muito tocadas pelos profissionais da saúde. Os isolados de VRE do ambiente e equipamentos mostraram uma tipagem molecular idêntica aos isolados de pacientes em 76% dos casos. Os resultados indicaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$), na proporção de contaminação do ambiente e equipamentos por VRE ao se comparar a fase pré-intervenção (23%) com um ano após a intervenção (2,4%) e essa diminuição foi associada a uma diminuição significativa da colonização e infecções por VRE por 1.000 pacientes/dia. O estudo comprovou, portanto, que ações simples de intervenção, baseadas em precauções de contato, higienização das mãos e treinamento sobre procedimentos de limpeza do ambiente, podem reduzir a contaminação ambiental e de equipamentos por VRE e que essas ações foram responsáveis pela diminuição significativa das taxas de colonização e infecção de pacientes por VRE, demonstrando o papel da contaminação do ambiente e equipamentos na transmissão cruzada e como reservatórios de VRE nas instituições de saúde (PERUGINI, *et al.*, 2011).

Estudos de modelagem matemática consideram mais frequentemente as seguintes medidas para o controle de IRAS: higienização das mãos, isolamento de pacientes, coorte de profissionais da saúde, uso racional de antimicrobianos e rastreamento (VAN KLEEF *et al.*, 2013). Dentro dessas diversas estratégias para diminuição da contaminação de superfícies por patógenos destacam-se a redução das chances de transmissão indireta por profissionais da saúde, alcançada principalmente com o aumento da adesão à higienização das mãos, e a melhoria dos processos de limpeza e desinfecção de superfícies, que passa pela educação constante do operador e pela necessidade de realizar melhorias no *design* e materiais hospitalares, além da busca por novos produtos e tecnologias de limpeza e desinfecção, de forma a tornar o processo mais eficiente (OTTER *et al.*, 2013a).

As instituições de saúde têm enfrentado a necessidade de avaliação da eficiência dos procedimentos de limpeza e desinfecção do ambiente, tanto em atendimento às recomendações das agências de saúde, como também como ferramenta de combate às IRAS. Atualmente, diversas ferramentas têm sido amplamente utilizadas, como *swabs* de ambiente para cultivo, géis fluorescentes e medição de ATP (adenosina trifosfato) nas superfícies utilizando um ensaio de luciferase e luminômetro (CARLING; BARTLEY, 2010). Com base nos resultados obtidos, diversas melhorias em relação aos produtos, equipamentos e procedimentos adotados podem ser realizadas. Novos

métodos para limpeza e desinfecção são cada vez mais acessíveis, como produtos à base de microfibras, gases microbicidas, sistemas de vaporização, emissores de ultravioleta (UV), ionizadores de ar e etc. (DANCER, 2011). Nesse sentido, há uma discussão recente sobre sistemas de desinfecção automatizados de ambientes, conhecidos como NTD (em inglês, “*no-touch disinfection*”), que removem ou reduzem a dependência do operador para conseguir uma distribuição e tempo de contato adequados com os agentes de desinfecção - o vapor de peróxido de hidrogênio e radiação UVC têm sido acoplados aos sistemas NTD (OTTER *et al.*, 2013b). Outro exemplo são as chamadas superfícies antimicrobianas ou “auto desinfetantes”, que levam à morte e inibem o crescimento de microrganismos, como as superfícies de cobre: íons de cobre são tóxicos para os microrganismos, pois geram espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular (WEBER; RUTALA, 2013). A arquitetura dos ambientes das instituições de saúde também tem sido um ponto recente de discussão. Estratégias de *design* de ambientes podem ser utilizadas para minimizar os riscos de infecção, como a construção de quartos individuais para pacientes, sistemas de ar com fluxo unidirecional e verticalizado nas salas cirúrgicas, utilização de ventilação natural em alguns ambientes e pias com ativação automática e que evitem espirros (OLMSTED, 2016; BARTLEY; OLMSTED; HAAS, 2010).

Em outra frente, está a importância da adesão à higienização das mãos por parte dos profissionais da saúde. A WHO tem utilizado uma estratégia de conscientização para promover a higienização das mãos nos cinco momentos mais críticos de cuidado do paciente: antes do contato com paciente, antes de realizar um procedimento asséptico, após risco de exposição a fluidos corporais, após o contato com o paciente e após contato com as áreas próximas ao paciente (WHO, 2009). A baixa adesão à higienização das mãos está entre os fatores que mais auxiliam a disseminação de IRAS. Apesar da importância amplamente reconhecida da higiene das mãos para prevenir a transmissão de IRAS e o fato de que a higienização das mãos é um ato simples, a adesão dos profissionais a essas práticas é baixa em muitos locais do mundo (a taxa de adesão é menor que 40%, em média), especialmente, mas não somente, em instituições com poucos recursos. A boa adesão à higienização das mãos se conecta principalmente à disponibilização de álcool em gel (na maioria das vezes não há necessidade de lavagem das mãos com água e sabão) e a outros materiais para higienização das mãos. Por outro lado, os principais fatores apontados que justificariam a baixa adesão à higienização das mãos pelos profissionais de saúde são (ALLEGIANZI;

SAX; PITTET, 2013; ALLEGRANZI; PITTET, 2009; WHO, 2009):

- Falta de tempo, especialmente devido ao elevado número de oportunidades de higienização das mãos por hora de atendimento ao paciente.
- Falta de agentes adequados para a higienização das mãos.
- Falta de pias e dispensadores de sabonete e álcool em gel ou sua localização inconveniente
- Danos à pele causados por algumas formulações.
- Pertencer a uma determinada classe profissional (por exemplo, médicos, enfermeiros assistentes, fisioterapeutas, etc.).
- Trabalhar em áreas específicas (como UTI, emergência).
- Falta de pessoal e superlotação.
- Uso de luvas.

Outro fator que contribui para a baixa adesão de higienização das mãos que se destaca são os altos níveis de IRAS encontrados especialmente em países em desenvolvimento, com sistemas de saúde carentes de recursos financeiros e humanos (ALP; DAMANI, 2015; MURNI *et al.*, 2013; PITTET *et al.*, 2008; RAZA *et al.*, 2004). Diversos hospitais brasileiros vivem a realidade de possuírem na instituição microrganismos multirresistentes endêmicos, que aliada às dificuldades no serviço de controle de IRAS, auxiliam para que os repositórios desses patógenos sejam mantidos. Segundo Munoz-Price (2015) a endemicidade prolongada de um patógeno na instituição faz com que as infecções devidas a esse patógeno sejam aceitas como um simples fato pelos profissionais da saúde de algumas unidades, uma norma e não uma exceção. Essa observação permite concluir que são necessárias ações concretas, que demonstrem e convençam os profissionais da saúde desse conceito equivocado e que promova uma mudança de comportamento.

A WHO, dentro programa “*Clean Care is Safe Care*”, fornece orientações para que as instituições de saúde possam aprimorar a adesão à higienização de mãos, que envolve: mudanças no sistema (fazer com que a higienização das mãos seja possível, fácil e conveniente), treinamento da equipe, monitoramento de indicadores de higienização das mãos e feedback de desempenho, lembretes nos locais de trabalho, melhoria do clima institucional em relação à segurança do paciente (promover a participação ativa individual e da instituição como um todo e garantir o empoderamento do paciente). O sucesso dessa estratégia multifacetada depende de que cada elemento seja considerado essencial para o sucesso global (ALLEGRANZI; SAX; PITTET, 2013; WHO, 2009).

Uma revisão de literatura realizada por Murni e colaboradores

(2013), com foco nos sistemas para prevenção de IRAS que têm sido utilizados em países em desenvolvimento, revelou que há ainda poucos estudos disponíveis sobre estratégias de intervenção nesses países. Os estudos disponíveis possuem uma qualidade moderada e em sua maioria utilizam abordagens que verificam as taxas de IRAS “antes e depois” da estratégia de intervenção adotada, em estudos não randomizados. A estratégia de intervenção mais utilizada é a chamada multifacetada (pacotes de medidas), sendo que a maioria reporta uma redução significativa das taxas de IRAS após a intervenção. Esses resultados refletem o uso das recomendações internacionais de boas práticas, porém dificultam o entendimento sobre quais medidas em específico foram as responsáveis pelo efeito de redução observado. No entanto, os autores puderam observar que a prática da higiene das mãos se mostrou como a evidência mais forte para a redução das taxas de IRAS e que a associações dessa medida com outras de controle de infecção reduz a incidência de IRAS. Outra constatação foi sobre a escassez de estudos nos países em desenvolvimento sobre o uso racional de antimicrobianos, um dado preocupante, uma vez que para reduzir as taxas de IRAS, é importante utilizar medidas que simultaneamente possam combater a contaminação cruzada pelos profissionais da saúde e promover o uso racional de antimicrobianos, de forma a reduzir a colonização ambiental por bactérias resistentes (MURNI *et al.*, 2013).

Pesquisadores europeus, em 2011, apontaram perspectivas para as pesquisas científicas, sobre o que precisaria ser melhor compreendido na década seguinte sobre as IRAS, de forma a auxiliar no seu controle. Todas as perspectivas apontadas envolvem intimamente questões relativas ao ambiente das instituições de saúde e seus profissionais (DETTENKOFER *et al.*, 2011):

- Impacto do ambiente nas IRAS: superfícies, mãos e etc.: a higienização das mãos e mais especificamente o uso de álcool em gel é o componente mais importante nas medidas de precaução. A contaminação ambiental ubíqua por microrganismos representa um risco. Quando essas superfícies são tocadas pelos profissionais da saúde, microrganismos podem ser transmitidos aos pacientes se a adesão à higienização das mãos é baixa, o que é a realidade na maioria das instituições de saúde. O impacto da contaminação ambiental nas IRAS e o custo-efetividade da desinfecção de superfícies *versus* limpeza comum continuam a ser questões cientificamente não resolvidas, apesar do crescimento gradativo de literatura. Há necessidade de novos investimentos na melhoria da arquitetura hospitalar, que tem sido

deixada de lado, muitas vezes com a justificativa de falta de recursos. Porém, a economia que pode ser obtida pela baixa prevalência de IRAS, principalmente aquelas causadas por microrganismos multirresistentes, pode compensar esses custos.

- Isolamento e rastreamento para o controle de microrganismos multirresistentes: o isolamento é comumente utilizado para prevenir a disseminação de microrganismos de alto impacto, incluindo os multirresistentes. Porém, há diferenças consideráveis entre as práticas adotadas por diferentes países ou regiões. As pesquisas devem ser realizadas para determinar o impacto das medidas de isolamento nas IRAS. Também deve ser aprofundada a pesquisa sobre o papel do rastreamento ativo de microrganismos multirresistentes, principalmente em relação aos encargos e custos financeiros para as instituições de saúde (estudo da relação custo/benefício).
- Vigilância de IRAS: a maior discussão deve ser em torno da notificação obrigatória dos dados de vigilância das IRAS pelas instituições de saúde, medida que é crucial para auxiliar a prevenção e controle eficaz das IRAS. Dados publicamente disponíveis sobre IRAS ajudam a influenciar a opinião pública. A validade e a comparabilidade dos dados são essenciais.
- Novas tecnologias para o controle de infecções: há muitas inovações e novas tecnologias que auxiliam o controle de IRAS, por exemplo, a realização de procedimentos minimamente invasivos, utilização das tecnologias de salas limpas na arquitetura de salas cirúrgicas, utilização de peróxido de hidrogênio em desinfecção de alto nível para melhorar a descontaminação de ambientes, uso de sistemas práticos para estimular a adesão à higienização de mãos pelos profissionais da saúde, como o uso de dispensadores automáticos ou observação por vídeo. Porém, a introdução dessas novas tecnologias precisa ser monitorada - sua usabilidade e custo-efetividade são fatores que precisam ser cientificamente avaliados.

2.4 Novas tecnologias para o combate às IRAS

Estudos tradicionais envolvendo as IRAS, mesmo quando utilizam novas tecnologias de biologia molecular, têm sido focados e conduzidos especialmente em microrganismos específicos e que são cultiváveis, com o objetivo de realizar a sua caracterização e estabelecer possíveis rotas de disseminação, por exemplo, em um evento de surto (CAMPOS *et al.*, 2016; HAMMERUM *et al.*, 2016; SNYDER *et al.*, 2013; ANSALDI *et al.*, 2011). Esses estudos são valiosos no contexto de controle de IRAS, uma vez que permitem a caracterização de cenários que são recorrentes em diversas instituições de saúde e, com isso, auxiliam na tomada de decisão, a fim de que um cenário futuro mais favorável possa ser enfrentado com mais segurança.

No entanto, observa-se uma simplificação da complexidade implicada na análise do microbioma associado às IRAS. As tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho têm revolucionado o entendimento sobre a composição microbiológica aplicada a diversas áreas do conhecimento, especialmente pelo fato de poder ser utilizada para conduzir estudos em larga escala e não dependentes do cultivo de microrganismos (LAX; GILBERT, 2015).

Na área da saúde humana, os estudos do microbioma têm sido conduzidos amplamente voltados a fins específicos, como o conhecimento de padrões de doenças complexas ou para o conhecimento da composição microbiológica de diversos sítios (SHREINER; KAO; YOUNG, 2016; MARCHESI *et al.*, 2016; MCDONALD; BIRMINGHAM; KNIGHT, 2015; TILG, ADOLPH, 2015). Em relação à ecologia microbiana, também têm sido reportados diversos estudos que correlacionam o impacto de ambientes construídos e da sua ocupação na dinâmica da comunidade de microrganismos (KEMBEL *et al.*, 2014; LAX *et al.*, 2014; KELLEY; GILBERT, 2013; KEMBEL *et al.*, 2012). Nesse contexto, os hospitais se apresentam como modelos para o estudo das comunidades microbianas de ambientes construídos, tanto por sua conexão óbvia com o bem-estar humano quanto por permitir a normalização de quase todos os fatores físicos, como materiais de construção, temperatura, humidade e ventilação, permitindo o estudo mais padronizado das interações microbianas entre os seres humanos e o ambiente. Com um conjunto definido de fontes microbianas, como pacientes, profissionais da saúde, água e ar, é possível elucidar padrões de transferência microbiana dentro dos hospitais e determinar como os membros dessas comunidades microbianas persistem e crescem em resposta a regimes de limpeza e

escolhas arquitetônicas. Por exemplo, estudos de metagenômica com a utilização de sequenciamento do gene 16S rRNA permitem a caracterização de microrganismos mesmo quando estes estão em baixa abundância ou não são cultiváveis, podendo ajudar a rastrear a disseminação de um táxon específico de bactérias através do ambiente hospitalar, uma informação crítica quando se quer determinar o papel das superfícies e equipamentos hospitalares na disseminação de IRAS. Avanços importantes podem ser alcançados: determinação de fontes e reservatórios de microrganismos associados às IRAS, escolha de melhores estratégias de limpeza e protocolos de descontaminação, caracterização do efeito das escolhas arquitetônicas e tecnológicas na ecologia do microbioma do hospital, aprofundamento da origem e disseminação da resistência aos antimicrobianos, etc. Ou seja, as tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho para estudos do microbioma tem o potencial de revolucionar a compreensão sobre como os microrganismos colonizam, se disseminam e evoluem nos ambientes das instituições de saúde. É essencial que esforços sejam realizados para compreender a ecologia destes ambientes, de forma a elucidar os mecanismos pelos quais o microbioma ambiental pode influenciar os desfechos para os pacientes, a origem e estrutura de surtos e na evolução da resistência aos antimicrobianos, colaborando para o controle de IRAS nas instituições (LAX; GILBERT, 2015).

O *Hospital Microbiome Project*, conduzido pela Universidade de Chicago, é um amplo projeto de microbioma hospitalar, que tem como objetivos centrais determinar quais parâmetros ambientais têm maior influência no desenvolvimento de comunidades microbianas dentro de um hospital e compreender como os dados demográficos interagem com a sucessão de microrganismos em um hospital (LAX *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2015; DEDESKO *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2013; SHOGAN *et al.*, 2013). O projeto possui um viés ecológico e foi realizado ao longo da construção e ocupação de um novo hospital, sediado na cidade Chicago, nos Estados Unidos. Os principais achados publicados foram (LAX *et al.*, 2017):

- Amostras de pele dos pacientes e profissionais da saúde foram as menos diversas, enquanto que aquelas amostras que interagem com o ambiente externo, como sapatos, chão e ar (circulação interna), foram as mais diversas.
- As bactérias dos leitos dos pacientes, particularmente das grades de cama, estão associadas com a microbiota da pele do paciente que ocupa o leito.

- As comunidades bacterianas dos pacientes e das superfícies das salas tornaram-se cada vez mais semelhantes ao longo da estadia do paciente.
- As correlações temporais na estrutura da comunidade demonstram que os pacientes inicialmente adquiriram táxons associados à sala que antecederam a sua internação, mas que suas próprias assinaturas começaram a influenciar a estrutura da comunidade microbiana do leito ao longo do tempo da sua internação.
- As comunidades microbianas das mãos dos profissionais da saúde são mais parecidas com a microbiota das superfícies hospitalares do que as comunidades microbianas de pacientes, provavelmente como resultado da maior mobilidade dos profissionais no hospital.
- Os padrões de beta diversidade agruparam as amostras em três conjuntos: o primeiro inclui amostras da pele de pacientes, amostras de nariz da equipe de profissionais da saúde e luvas de látex não utilizadas; o segundo conjunto foi composto por amostras de piso e a maioria das amostras dos postos de enfermagem; o terceiro foi composto por vestimentas dos profissionais da saúde e pertences pessoais, como sapatos e telefones celulares, sendo esse conjunto mais semelhante ao segundo agrupamento de amostras.
- A diversidade alfa e beta* das amostras da pele dos pacientes foram associadas apenas de forma fraca ou não significativa a fatores clínicos como quimioterapia, uso de antibióticos e recuperação cirúrgica.
- As análises metagenômicas revelaram que os genes que conferiam resistência antimicrobiana eram consistentemente mais abundantes nas superfícies da sala do que na pele dos pacientes que habitavam essas salas.

*NOTA: A alfa-diversidade é uma medida sobre a riqueza de espécies em um determinado nicho ecológico – uma amostra ou conjunto de amostras, por exemplo. A beta-diversidade é uma medida que permite comparar a diversidade entre dois nichos ecológicos – entre amostras ou dois grupos de amostras diferentes.

Diversos estudos focados em determinadas unidades hospitalares também têm sido conduzidos, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva, que demonstram a correlação da microbiota de pacientes com a estrutura física dessas unidades críticas (BROOKS *et al.*, 2014; HEWITT *et al.*, 2013; OBERAUNER *et al.*, 2013).

Oberauner e colaboradores (2013) utilizaram pirosequenciamento do gene 16S rRNA para pesquisar o microbioma do ambiente de uma UTI e realizaram uma comparação dos resultados obtidos, para algumas amostras pareadas, com métodos dependentes de cultura para a identificação de bactérias. Os resultados mostraram que o método dependente de cultura conseguiu recuperar apenas 2,5% da diversidade bacteriana identificada pelo método de pirosequenciamento.

Brooks e colaboradores (2014) realizaram pesquisa para testar a hipótese de que superfícies de alto contato são uma fonte predominante para a colonização do trato gastrointestinal de bebês prematuros em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais. Para isso, amostras de fezes foram coletadas no primeiro mês de vida de dois bebês, em conjunto com amostras de superfícies de alto contato dos leitos de internação desses bebês. O sequenciamento de DNA de alto desempenho do gene 16S rRNA e análises refinadas de bioinformática puderam identificar que os tubos, a incubadora e as mãos dos profissionais são os reservatórios mais prováveis para a colonização do trato gastrointestinal dos bebês prematuros (BROOKS *et al.*, 2014).

Hewitt e colaboradores (2013) utilizaram o sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V2 do gene 16S rRNA para investigar a diversidade de bactérias em superfícies e equipamentos de uma UTI Neonatal. As coletas se focaram em superfícies que são muito tocadas pelos profissionais de saúde antes do contato com os pacientes, mas foram incluídas também superfícies que não possuem contato com as mãos de profissionais. O sequenciamento de DNA de alto desempenho não dependente de cultivo revelou uma diversidade microbiológica muito maior e nunca antes vista em estudos anteriores, que utilizam métodos dependentes de cultura. Cada uma das superfícies pesquisadas mostrou, em média, uma diversidade de 100 gêneros de bactérias. Foram encontradas diversas bactérias que são reconhecidas como patógenos oportunistas, frequentemente reportadas nos estudos dependentes de cultura como associadas às IRAS em pacientes neonatais; dentre elas as mais abundantes foram: *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus* spp. Outros patógenos oportunistas que rotineiramente causam IRAS, como *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp. e *Clostridium* spp., também

foram identificados. Foi identificado também um número substancial de bactérias que são de difícil cultivo. Outros dados consistentes foram a identificação de um conjunto de amostras que divergiu das demais, por ter apresentado excesso de Enterobacteriaceae, em uma clara contaminação por fezes, e a alta proporção de gêneros de bactérias associadas à pele humana, o que reforça a ideia de que as mãos humanas são vetores importantes na transmissão de bactérias nessas unidades hospitalares. Os autores apontaram a necessidade de estudos futuros que integrem esses métodos moleculares com a avaliação, a longo prazo, da diversidade bacteriana de superfícies e taxas de IRAS, além da investigação sobre os processos de limpeza e colonização das superfícies pelas mãos humanas (HEWITT *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o sequenciamento de DNA de alto desempenho tem o potencial de mudar a microbiologia clínica de diversas formas. O sequenciamento completo do genoma tem sido usado para descrever de forma detalhada aspectos da transmissão, biologia e epidemiologia de diversos microrganismos relevantes no contexto clínico. O número de genomas disponíveis é cada vez maior, o que auxilia no desenvolvimento de novos testes tipo “*Point of Care*” (POC), que poderá dar mais agilidade ao processo diagnóstico de infecções. Gradualmente, observa-se o aumento na velocidade, a diminuição de custos e aumento do poder discriminatório e da qualidade das técnicas de sequenciamento, tornando-o uma ferramenta ideal para a rotina dos laboratórios de microbiologia clínica para diagnóstico e controle de infecções. Essa técnica tem o potencial de vir a substituir diversas outras existentes, com a possibilidade de realizar diversos testes a partir de uma única amostra biológica, como identificação de microrganismos, identificação de mecanismos de resistência e virulência e genotipagem, sendo especialmente adequada ao controle de infecções. Além disso, o sequenciamento, por não ser dependente de cultivo, se torna relevante para a caracterização de bactérias não cultiváveis e tem provado que é muito útil para decifrar a complexidade do microbioma. Os desafios são, principalmente: conseguir lidar com um novo tipo de dado (sequências genômicas), que vem em grande volume, de forma a ajustar os protocolos analíticos e disponibilizar de forma facilitada essa nova tecnologia aos laboratórios de microbiologia clínica; a necessidade de padronização e interpretação mais automatizada dos resultados, de forma a traduzir os dados em informações relevantes, permitindo o melhor aproveitamento dos dados; a necessidade da constante melhoria dos bancos de dados, do compartilhamento de informações, assim como o desenvolvimento da bioinformática, de modo a fornecer informações

relevantes a partir das sequências genômicas. Os avanços já alcançados e aqueles que ainda estão por vir poderão estimular que microbiologistas, infectologistas e epidemiologistas possam utilizar o sequenciamento de DNA de alto desempenho para aprofundar a investigação de surtos, de forma a mudar o seu curso, incrementar a vigilância de infecções e implementar medidas de controle em tempo real (TANG *et al.*, 2017; FOURNIER; DUBOURG; RAOULT, 2014).

De acordo com o observado em diferentes publicações, a utilização de metodologias moleculares avançadas pode incrementar significativamente a eficácia e desempenho das técnicas de rastreamento, identificação e pesquisa do microbioma e da resistência aos antimicrobianos, de forma a auxiliar significativamente o combate às infecções relacionadas à assistência à saúde. O rastreamento ativo, baseado nessas novas tecnologias, e medidas como a administração racional de antimicrobianos, aumento na adesão à higienização das mãos, utilização consciente da precaução de contato e isolamento, podem permitir o controle eficaz e limitar a disseminação de bactérias multirresistentes, propiciando controles das IRAS, melhoria dos desfechos para os pacientes e redução de custos para as instituições de saúde.

As novas tecnologias moleculares aplicadas na área da saúde só podem ter um grande impacto para o paciente quando a velocidade diagnóstica permite que as decisões médicas apropriadas sejam tomadas rapidamente. Todas as alternativas podem trabalhar de forma complementar para fornecer uma harmonização de técnicas, adequadas às necessidades criadas pela problemática de cada instituição de saúde (FOURNIER *et al.*, 2013; DUNNE; WESTBLADE; FORD, 2012). Segundo Dunne, Westblade e Ford (2012) “*claramente, é um momento emocionante para microbiologia clínica*”.

3 HIPÓTESE

Com base no exposto, a presente tese de doutorado avaliou a seguinte hipótese:

Métodos moleculares genotípicos de rastreamento e identificação são mais efetivos para o entendimento da relação entre a contaminação do ambiente hospitalar e a colonização de pacientes e de profissionais da saúde por bactérias relevantes no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), constituindo-se em importantes aliados no manejo de tais infecções.

4 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo da microbiota bacteriana associada às IRAS no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, relacionando achados de pacientes, profissionais da área da saúde e do ambiente hospitalar.

4.1 Objetivos específicos

- Comparar os métodos com e sem o cultivo celular na recuperação e identificação de espécies bacterianas de relevância no contexto das IRAS.
- Identificar as contribuições dos métodos bioquímico e molecular na caracterização da resistência aos antimicrobianos.
- Avaliar o perfil microbiológico e diversidade das bactérias associadas às IRAS identificadas nas unidades do hospital, bem como nos diferentes sítios de coleta em pacientes, profissionais da saúde e pontos comuns da estrutura hospitalar.
- Correlacionar dados clínicos e da rotina de trabalho dos profissionais da saúde com os dados obtidos do rastreamento e caracterização de bactérias associadas às IRAS.
- Identificar pontos críticos de contaminação por bactérias associadas às IRAS.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental

O presente estudo é parte integrante do projeto maior intitulado “Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar” (em inglês nomeado como “*Healthcare Associated Infections Microbiome Project*” – HAIMP), desenvolvido no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis/SC), um hospital-escola de nível terciário responsável pela prestação de assistência em diferentes níveis de complexidade, que conta com aproximadamente 200 leitos. O projeto de pesquisa é desenvolvido por meio de uma parceria entre a UFSC e a empresa Neoprospecta Microbiome Technologies, tendo sido aprovado por meio da Plataforma Brasil pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC) (nº 32930514.0.0000.0121). Assim, os participantes do projeto foram esclarecidos sobre os seus objetivos e participaram voluntariamente, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

A seguir, seguem os critérios utilizados para o desenho experimental do projeto de pesquisa em questão:

- O estudo foi desenvolvido ao longo de um ano, considerando, dessa forma, as mudanças sazonais. Para a presente tese de doutorado, foram considerados e analisados os dados do primeiro semestre, o que permitiu o estudo mais consolidado dos padrões e variações das populações bacterianas.
- Foram incluídas no estudo cinco unidades hospitalares distintas, que conjuntamente formam um fluxo constante de entrada e saída de pacientes.
- Foram utilizados dois métodos distintos de coleta e processamento das amostras: dependentes e não dependentes do cultivo celular (DC e NDC). Essa abordagem permitiu a comparação de diferentes metodologias para acessar a composição das populações bacterianas.
- As superfícies a serem coletadas foram escolhidas após observação da rotina das unidades e alguns ajustes foram realizados após uma coleta piloto, em novembro de 2014 (dados não mostrados). Os objetivos da coleta piloto foram o treinamento da equipe de coleta, a homogeneização do método de coleta e

confirmação da relevância em relação à contaminação microbiológica dos pontos de coleta escolhidos. Foram escolhidas superfícies de alto contato (HUSLAGE *et al.*, 2010), que são superfícies muito tocadas por profissionais de saúde, pacientes ou seus acompanhantes (por exemplo, equipamentos médicos do quarto, como o suporte de soro e régua de gases, balcão e telefones do posto de enfermagem, área de preparo de medicamentos, eletrodomésticos da copa dos profissionais da saúde).

- Os critérios de inclusão para os pacientes foram a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o maior tempo de internação na unidade hospitalar (não historicamente, mas sim da internação vigente: no dia da coleta os tempos da internação vigente dos pacientes da unidade hospitalar a ser coletada foram comparados; foram selecionados os pacientes que apresentaram o maior tempo de internação, em dias). Assim, os pacientes não necessariamente apresentavam diagnóstico de infecção relacionada à assistência a saúde (IRAS), tão pouco estavam sabidamente colonizados por microrganismos importantes nesse contexto. O critério do maior tempo de internação foi adotado para que os episódios de relação entre contaminação microbiológica do ambiente e do paciente pudessem ser monitorados com maior frequência.
- O paciente que aceitava participar da pesquisa tinha o seu quarto escolhido para o rastreamento, assim seria possível fazer a correlação das amostras ambientais e clínicas.
- Os critérios de inclusão para os profissionais da saúde foram a assinatura do TCLE e o vínculo empregatício com o HU/UFSC. O vínculo empregatício garante que o profissional tenha contato contínuo com a unidade hospitalar ao qual está vinculado, bem como com os pacientes nela internados. Não foram incluídos estudantes de qualquer curso de graduação ou pós-graduação que porventura estivessem realizando atividades no hospital.
- Três sítios de coleta foram escolhidos para os pacientes (mãos, narinas e reto) e profissionais da saúde (mãos, vestimenta e celular de uso pessoal), de forma que também pudesse ser realizada uma correlação da colonização entre os diferentes sítios, bem como o ambiente circundante desses pacientes e profissionais de saúde. Foram considerados sítios utilizados comumente para estratégias de rastreamento de IRAS e

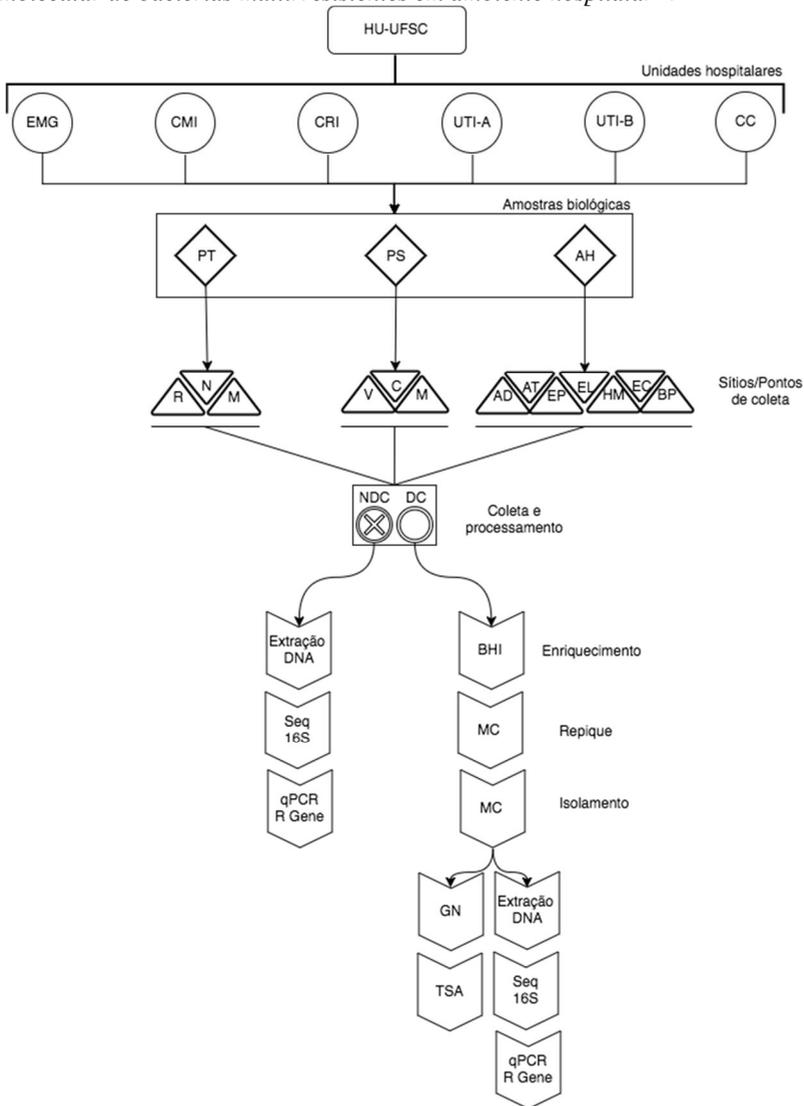
microrganismos multirresistentes (como reto e narinas) e sítios que pudessem ter maior relação com o ambiente ao seu redor, bem como com a disseminação de microrganismos (mãos, vestimentas e celulares).

- As amostras DC foram inoculadas em meio de cultura rico em nutrientes e isoladas em meio seletivo para bactérias Gram-negativas, sem adição de antimicrobianos, para não haver um viés da prevalência dos BGN recuperados.

O fluxograma do desenho experimental do projeto de pesquisa, que será detalhado a seguir, pode ser visualizado na Figura 5.

Para o presente estudo, foram utilizados os dados referentes ao primeiro semestre do projeto de pesquisa, compreendido de abril a setembro de 2015.

Figura 5. Desenho experimental utilizado para a coleta e processamento de amostras biológicas do projeto “Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar”.



EMG: emergência. CMI: clínica médica I. UTI-A unidade de terapia intensiva A. UTI-B unidade de terapia intensiva B. CRI: clínica cirúrgica I. CC: centro cirúrgico. PT: pacientes. PS: profissionais da saúde. AH: ambiente hospitalar.

R: reto. N: narinas. M: mãos. V: vestimenta. AD: pontos da área de descanso dos profissionais da saúde. AT: pontos da área de trabalho dos profissionais da saúde. EP: equipamentos do centro cirúrgico. EL: equipamentos do leito. HM: equipamentos de higienização de mãos. EC: equipamentos médico hospitalares de uso comum. BP: banheiro de pacientes. NDC: não dependente de cultivo. DC: dependente de cultivo. Seq 16S: sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA. qPCR RGene: identificação de genes codificantes de beta-lactamases por PCR em tempo real. BHI: meio de cultura para enriquecimento celular bacteriano. MC: meio de cultura McConkey para repique e isolamento de bactérias Gram-negativas. GN: método automatizado de identificação fenotípica. TSA: método automatizado para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

5.2 Local de estudo e amostras biológicas

Para a coleta de amostras, foram escolhidas cinco unidades distintas dentro do hospital:

- Emergência (EMG)
- Unidade de terapia intensiva (UTI)
- Centro cirúrgico (CC)
- Clínica cirúrgica I (CRI)
- Clínica médica I (CMI).

A UTI possui duas áreas distintas: UTI-A, que recebe pacientes em estado de saúde menos grave, e a UTI-B, que recebe pacientes em estado de saúde mais grave. A CMI recebe principalmente pacientes em isolamento e precaução de contato, mas não exclusivamente, e é considerada pelo hospital uma “unidade de isolamento”. O CC realiza cirurgias de médio e alto nível de complexidade e a CRI recebe os pacientes pré e pós-cirúrgicos. A EMG atende pacientes adultos, uma vez que o hospital possui pronto atendimento infantil exclusivo.

Foram realizadas coletas mensais durante seis meses consecutivos em todas as unidades hospitalares escolhidas. As coletas de todas as unidades foram realizadas em dois dias consecutivos, uma vez ao mês, em datas pré-agendadas com o Serviço de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (SCIRAS) do HU-UFSC, porém sem conhecimento prévio dos setores em questão, evitando assim mudanças na rotina hospitalar que pudessem interferir na coleta e análise de dados.

Os pontos de coleta de cada unidade foram determinados após análise prévia à primeira rodada de coletas (dados não mostrados). A análise prévia considerou os aspectos estruturais, o número de profissionais da área da saúde, além do número médio de pacientes

atendidos diariamente nos setores hospitalares escolhidos para a coleta de amostras e dados. Após a análise dos resultados da coleta piloto, foram ajustados e mantidos os mesmos pontos de coleta ao longo de todo o período do estudo.

De abril a setembro de 2015 as coletas de amostras foram realizadas em cada ponto utilizando simultaneamente dois *swabs* distintos. Um *swab* com ponta de rayon e meio de transporte Amies (Copan Inc., Itália), mantidos em refrigeração (aproximadamente 4 °C) até o início do processamento (ANVISA, 2013c), para aplicação das técnicas microbiológicas dependentes do cultivo celular (DC). Um segundo *swab*, com ponta de algodão, transportado a seco e mantido em temperatura ambiente até o processamento, para aplicação de técnicas não dependentes de cultivo celular (NDC). Previamente à coleta, ambos os *swabs* foram umedecidos com soro fisiológico estéril (ampolas individuais) (ANVISA, 2013c). Para amostras biológicas que não puderam ser coletadas de forma simultânea (como *swab* retal e *swab* nasal), deu-se preferência para a coleta do *swab* destinado à abordagem DC primeiramente (*swab rayon* com meio de transporte) e posterior coleta do *swab* destinado à abordagem NDC (*swab algodão seco*). Desta forma, foram monitorados mensalmente 180 pontos de coleta. No total, foram coletadas (DC e NDC) 1.080 amostras pareadas, entre pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar (Tabela 2). O Anexo 3 apresenta todos os pontos de coleta que foram monitorados na vigência do projeto, com descrição detalhada dos mesmos.

Tabela 2. Descrição e distribuição das amostras coletadas em duplicata para análises DC e NDC pelo projeto HAIMP de abril a setembro de 2015.

Fonte	Pontos de coleta	Unidades hospitalares						TOTAL N (%)
		CC	CRI	CMI	EMG	UTI-A	UTI-B	
Pacientes	Mãos, narinas e reto	0	36	36	54	36	36	198 (18,3%)
Profissionais da saúde	Mãos, vestimenta e telefone celular	36	36	36	36	36	36	216 (20,0%)
Ambiente hospitalar	Equipamentos e banheiros dos leitos dos pacientes; equipamentos de centro cirúrgico; equipamentos de uso comum; áreas de trabalho dos profissionais da saúde; áreas de descanso dos profissionais da saúde	108	84	90	144	114	126	666 (61,7%)
TOTAL N (%)		144 (13,3%)	156 (14,4%)	162 (15,0%)	234 (21,7%)	186 (17,2%)	198 (18,4%)	1.080 (100,0%)

Fonte: modificado de CUNHA, 2017.

5.2.1 Amostras de pacientes

A escolha dos pacientes de cada unidade para participação no estudo foi realizada respeitando-se os seguintes critérios de inclusão:

- Paciente internado na unidade há mais tempo (internação vigente).

- Assinatura do TCLE.

Após a introdução realizada pela equipe de trabalho, os pacientes que aceitaram participar do estudo por meio do TCLE (Anexo 1) responderam a um questionário específico (Anexo 2) utilizado para coleta de dados e caracterização adequada da amostra coletada. Também foi realizada consulta aos prontuários destes pacientes, visando a obtenção de dados clínicos dos mesmos.

Os sítios de coleta de cada paciente foram: mãos, narinas e reto saúde (detalhamento dos pontos de coleta disponíveis no Anexo 3).

A coleta intencional e não aleatória de pacientes, respeitando os critérios de inclusão descritos, além dos sítios escolhidos, permitiram a observação mais frequente de episódios de contaminação entre o ambiente e o paciente, que pudessem ser correlacionadas. Como a escolha dos pacientes respeitou esses critérios, não houve coleta intencional de pacientes que sabidamente possuíam diagnóstico de IRAS ou colonização por bactérias relevantes nesse contexto. Assim, foi possível observar a atuação de um fator de risco relevante: a estadia prolongada no hospital, que por sua vez, aumenta a frequência de outros fatores de risco, como o uso de dispositivos invasivos e realização de cirurgias, por exemplo.

Foram coletadas amostras de pacientes atendidos na EMG, UTI, CMI e CRI. Pacientes atendidos no CC não participaram da pesquisa, uma vez que provinham de outras unidades de internação e sua estadia no CC se restringia ao tempo de cirurgia e recuperação da mesma, o que dificultava o processo de abordagem dos pacientes.

Participaram do estudo 66 pacientes, dos quais foram coletadas 198 amostras em duplicata para análises DC e NDC.

5.2.2 Amostras de profissionais da saúde

A escolha dos profissionais da saúde de cada unidade para participação no estudo foi realizada respeitando-se os seguintes critérios de inclusão:

- Vínculo empregatício com o HU/UFSC.
- Assinatura do TCLE.

Os profissionais de saúde participantes do estudo também assinaram um TCLE (Anexo 1) e responderam a um questionário específico (Anexo 2), para adequada caracterização da amostra. Os profissionais da saúde incluídos no estudo são oriundos de profissões variadas (enfermeiros, técnicos de enfermagem, fisioterapeutas e médicos) e possuíam vínculo empregatício com a instituição, aspectos que apontam um contato diário e frequente com os pacientes de cada unidade hospitalar investigada, durante toda a sua jornada de trabalho. Destes profissionais foram coletadas amostras das mãos, da vestimenta de trabalho (jaleco ou roupa privativa da unidade) e o do telefone celular de uso pessoal saúde (detalhamento dos sítios de coleta disponíveis no Anexo 3). Os sítios de coleta escolhidos permitiram identificar com maior frequência as correlações de contaminações com os diversos ambientes de trabalho.

Foram coletadas amostras de profissionais da saúde alocados nas diferentes unidades participantes do projeto de pesquisa: EMG, UTI, CMI, CRI e CC.

Participaram do estudo 72 profissionais da saúde, dos quais foram coletadas 216 amostras pareadas para análises DC e NDC.

5.2.3 Amostras do ambiente hospitalar

A coleta das amostras dos ambientes de cada unidade foi realizada com base na análise prévia, mantendo-se os mesmos pontos de coleta a cada mês (pontos críticos da estrutura). Foram coletados *swabs* de equipamentos médico-hospitalares, de móveis e acessórios dos leitos de pacientes participantes da pesquisa, de áreas de trabalho e de áreas de descanso dos profissionais de saúde (detalhamento dos pontos de coleta disponíveis no Anexo 3). Esses pontos de coleta se constituíam em “superfícies de alto contato”, ou seja, superfícies muito tocadas por profissionais da saúde ou pacientes. No primeiro e último mês de coletas foi realizado questionário específico com o responsável pela unidade participante, para se obter informações relativas aos procedimentos

rotineiros de limpeza e desinfecção concorrente e terminal, utilização de equipamentos de proteção individuais pelos profissionais da saúde, cuidados ao paciente, métodos de precaução de contato em caso de infecções, etc., que proporcionaram a adequada caracterização da amostra (Anexo 2).

Foram coletadas 666 amostras pareadas do ambiente hospitalar destinadas às análises DC e NDC.

5.3 Análises realizadas em amostras não dependentes de cultivo (NDC).

5.3.1 Extração de DNA

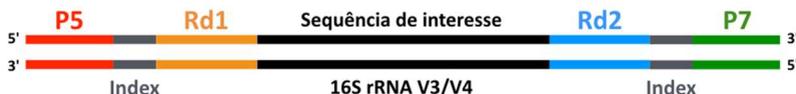
As amostras coletadas em *swab* seco foram submetidas diretamente à extração de DNA utilizando-se uma técnica baseada em *beads* magnéticas (AMPureXP, Beckman Coulter, USA) com um protocolo proprietário da empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Brasil). O DNA total obtido foi armazenado a -20 °C para as análises moleculares futuras. Para todos os processos de extração de DNA, foi utilizado um controle negativo de extração (CNE), composto pelo *swab* de algodão seco e estéril (idêntico ao utilizado nas coletas de amostras), acrescido da solução de lise celular e submetido ao processo de obtenção e purificação do DNA, concomitante ao processamento das amostras.

5.3.2 Sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3-V4 do gene 16S rRNA.

As bactérias presentes nas amostras coletadas em *swab* seco foram identificadas utilizando-se sequenciamento de DNA de alto desempenho das regiões V3-V4 do gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA). O protocolo de preparo das bibliotecas é proprietário da empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Brasil) e está parcialmente publicado (CHRISTOFF *et al.*, 2017). Resumidamente, para preparo das bibliotecas, são utilizadas duas etapas de amplificação (PCR). A primeira PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos 341F 5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3' (WANG; QIAN, 2009) e 806R 5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3' (CAPORASO *et al.* 2012). Os iniciadores contêm em sua estrutura adaptadores baseados naqueles

utilizados para a abordagem TruSeq (Illumina Inc., USA). A segunda PCR insere nas bibliotecas seqüências de indexadores, que permitem a identificação das amostras (Figura 9).

Figura 6. Estrutura final de uma biblioteca de DNA para sequenciamento de alto desempenho, baseada da abordagem TruSeq (Illumina Inc., USA).



P5 e P7: adaptadores para ligação na *flowcell* (MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA)). Index: seqüências que em combinação permitem a identificação das amostras por bioinformática. Rd1 e Rd2: iniciadores para o sequenciamento da seqüência de DNA de interesse.

As reações de PCR foram realizadas com Master Mix e a enzima Taq Platinum (Invitrogen, USA), em triplicata técnica, com as seguintes condições de amplificação: i) primeira PCR: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s, com extensão final de 72 °C por 2 min; ii) segunda PCR: 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C por 45s, 66 °C por 30s e 72 °C por 45s, com extensão final de 72 °C por 2 min. Para todas as reações de PCR foi acrescentado o CNE (controle negativo de extração) e um controle negativo de reação (CNR - ausência de DNA na primeira PCR). A reação final de PCR foi purificada utilizando-se um protocolo baseado em beads magnéticas (AMPureXP, Beckman Coulter, USA) e as bibliotecas foram unidas em um *pool* único para quantificação. A quantificação das bibliotecas foi realizada por qPCR com o kit *KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms* (KAPA Biosystems, USA) (CHRISTOFF *et al.*, 2017). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*, de acordo com as especificações do fabricante.

As seqüências obtidas foram submetidas aos processos de demultiplexagem, remoção (*trimming*) dos iniciadores e adaptadores e aplicação de filtros de qualidade utilizando-se um *pipeline* proprietário, intitulado *Sentinel* (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). O filtro de qualidade da seqüência (E), primeiramente, converte a qualidade de cada nucleotídeo (Q) em uma probabilidade de erro (e_i). A e_i de cada nucleotídeo da seqüência é então somada e posteriormente dividida pelo tamanho da seqüência (L) (Figura 10). O filtro de

qualidade permite no máximo 1% de erro acumulado para a sequência (CHRISTOFF *et al.*, 2017).

Figura 7. Fórmulas matemáticas que compõe o *pipeline Sentinel* e são utilizadas como filtro de qualidade das sequências de DNA de interesse, obtidas pelo sequenciamento de alto desempenho.

$$e_i = 10^{-\frac{Q_i}{10}} \quad E = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{L}$$

e_i : probabilidade de erro de um nucleotídeo. Q : *score* de qualidade de um nucleotídeo. E : probabilidade de erro da sequência de DNA de interesse. L : tamanho do fragmento (em pb). Fonte: CHRISTOFF *et al.*, 2017.

Para aumentar a confiabilidade das sequências, excluindo a possibilidade de diversidade gerada por sequências quiméricas ou nucleotídeos incorporados erroneamente na etapa de PCR, as sequências que passaram pelos procedimentos iniciais foram agrupadas em filotipos/*cluster* (agrupam sequências com 100% de identidade). Os *clusters* obtidos que apresentaram menos de cinco sequências, não foram considerados. As sequências agrupadas em *clusters* foram, assim, consideradas como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*) com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRefDB, Neopropecta) utilizando-se identidade mínima de 99% (CHRISTOFF *et al.*, 2017). Os controles utilizados ao longo do processo de montagem das bibliotecas de DNA (CNR e CNE) foram utilizados para remoção de possíveis contaminações advindas desse processo (*swab*, soluções de lise e extração de DNA, reagentes de PCR e etc.) por bioinformática.

Os resultados do sequenciamento provenientes da análise comparativa com o banco de dados NeoRefDB foram disponibilizadas à equipe da SCIH do HU-UFSC por meio da plataforma *online* Neobiome (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil), que permite a visualização dos resultados de sequenciamento de forma simples e intuitiva.

As análises de alfa-diversidade foram realizadas utilizando-se os modelos *Chao1* (CHAO, 1984), *Shannon index* (SHANNON; WEAVER, 1949), *Simpson's diversity* e *Simpson's dominance* (SIMPSON, 1949). As análises de beta-diversidade foram realizadas utilizando os índices *Bray-Curtis dissimilarity* (BRAY; CURTIS, 1957)

e *Jaccard similarity* (JACCARD, 1912). As significâncias entre o padrão do microbioma e os metadados das amostras analisadas foram acessados utilizando-se os testes ADONIS e ANOSIM (OKSANEN *et al.*, 2013) por meio da comparação das matrizes de beta-diversidade e a categorização das amostras (metadados).

Alguns gráficos foram elaborados a partir da plataforma SHAMAN (em inglês, *SHiny Application for Metagenomic ANalysis* - shaman.c3bi.pasteur.fr), que se baseia no software R (v3.1.1), pacote Bioconductor (v2.14).

5.3.3 Identificação de genes codificadores de beta-lactamases por PCR quantitativa em tempo real.

De acordo com a espécie bacteriana identificada por sequenciamento de DNA, um painel com os genes codificantes de beta-lactamases mais frequentemente encontrados no cenário brasileiro foi testado utilizando-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) com sondas de hidrólise e iniciadores específicos em uma configuração duplex ou triplex. Os genes testados foram: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-2 group}, *bla*_{CTX-M-8 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *bla*_{CTX-M-25 group}, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} and *bla*_{SPM-like}.

As reações de qPCR foram realizadas com um protocolo proprietário da empresa Neopropecta, em um volume final de 10 µL contendo 0,5 ng de DNA e Master Mix (sondas marcadas: Cy5[®], HEX[™] e FAM[™]; referência passiva ROX[™]; iniciadores *forward* e *reverse*). Um controle negativo de reação (ausência de DNA) e um controle positivo para cada gene de resistência foi incluído em cada ensaio de qPCR. Os controles positivos se constituíram de isolados bacterianos identificados com o gene de resistência específico e foram fornecidos pelo Laboratório ALERTA (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, responsável técnica Prof.^a Dr.^a Ana Gales). As amostras e controles foram analisadas em triplicata técnica. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), com as seguintes condições de amplificação: 95 °C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. De acordo com o *threshold* pré-estabelecido, foram consideradas positivas as amostras com C_q (ciclo de quantificação) <=33,0, para todos os marcadores.

5.4 Análises realizadas em amostras dependentes de cultivo (DC).

5.4.1 Cultura celular bacteriana

De acordo com uma adaptação do protocolo citado na Nota Técnica N° 01/2013 (ANVISA, 2013c), as amostras coletadas em meio de transporte Amies foram inoculadas em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (Becton, Dickinson and Company, USA) e incubadas por 12 a 18 horas a 36 °C (± 1 °C) em estufa bacteriológica. Após esta etapa de enriquecimento, as amostras em BHI foram homogeneizadas e semeadas por meio da técnica de esgotamento em placas de Petri descartáveis contendo ágar McConkey (Becton, Dickinson and Company, USA), um meio de média seletividade que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas, sendo as mesmas incubadas por 18 a 24 horas a 36 °C (± 1 °C). Unidades formadoras de colônia com características morfológicas diferentes foram isoladas por esgotamento em novas placas de ágar McConkey e incubadas por 18 a 24 horas a 36 °C (± 1 °C).

Após o isolamento, procedeu-se com a identificação fenotípica, realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e extração de DNA para sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA e detecção de genes codificantes para beta-lactamases por qPCR. Todos os isolados bacterianos foram criopreservados em nitrogênio líquido em caldo BHI suplementado com 15% de glicerol.

5.4.2 Identificação fenotípica

Os isolados de bactérias Gram-negativas foram submetidos à identificação fenotípica utilizando-se o sistema Vitek[®]2 (BioMérieux, Inc., USA) (cartão de identificação GN ID), conforme instruções do fabricante.

Os resultados da identificação fenotípica de isolados bacterianos Gram-negativos foram disponibilizadas mensalmente à equipe da SCIH do HU-UFSC por meio de planilhas eletrônicas.

5.4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de bactérias Gram-negativas foram submetidos ao Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) por meio do

sistema Vitek®2 (BioMérieux, Inc., USA) utilizando-se o cartão AST-N239, conforme instruções do fabricante.

Para o controle de qualidade foram utilizadas cepas ATCC (*American Type Culture and Collection*) *E. coli* 25922, *E. coli* 35218 e *P. aeruginosa* 27853.

A Nota Técnica nº 1/2010 (ANVISA, 2010b) destaca que: “considerando as dificuldades no tratamento das infecções por enterobactérias não sensíveis aos carbapenêmicos, recomenda-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para tigeciclina, polimixina B ou colistina por método dilucional não automatizado. A continuidade do tratamento com polimixina B ou colistina deve ser subsidiada pela confirmação da sensibilidade por determinação da CIM”.

O Alerta de Tecnovigilância nº 2300, datado de 24/05/2017, aponta que “recomendamos aos clientes (usuários do cartão Vitek AST N 239): usem um método alternativo (o qual eles deverão decidir qual implementar, com base na bibliografia técnica disponível na área de microbiologia), antes de publicarem resultados susceptíveis para colistina, quando usarem o cartão Vitek®2 AST N239” (ANVISA, 2018).

A publicação do alerta 2300 pela ANVISA se deu posteriormente aos ensaios realizados no presente estudo. Pelos motivos expostos, os resultados sensíveis para colistina apontados no presente estudo apresentam uma limitação a ser considerada.

Os resultados do TSA de isolados bacterianos Gram-negativos foram disponibilizadas mensalmente à equipe do SCIH do HU-UFSC por meio de planilhas eletrônicas.

5.4.4 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos Gram-negativos foi realizada conforme descrito no item 4.3.1. O DNA foi quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Após quantificação o DNA foi diluído a 0,5ng/µl e armazenado a -20 °C para as análises subsequentes.

5.4.5 Identificação de genes codificantes de beta-lactamases por PCR quantitativa em tempo real.

Após a identificação fenotípica, um painel com os genes codificantes de beta-lactamases foi testado nas amostras utilizando-se a técnica de qPCR segundo protocolo citado no item 4.3.3.

Os resultados da identificação de genes de resistência aos antimicrobianos em isolados bacterianos Gram-negativos foram disponibilizadas à equipe da SCIH do HU-UFSC por meio de planilhas eletrônicas.

5.4.6 Sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3-V4 do gene 16S rRNA.

Os isolados bacterianos Gram-negativos também foram identificados utilizando-se o sequenciamento de DNA de alto desempenho das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. O protocolo de preparo das bibliotecas e análises das sequências de DNA seguiram os passos citados no item 4.3.2., com adição de um passo de normalização das bibliotecas individuais (quantificação por meio do fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit - Invitrogen, EUA), anteriormente à formação do *pool* único para quantificação por qPCR.

Os resultados do sequenciamento provenientes da análise comparativa com o banco de dados NeoRefDB foram disponibilizadas à equipe da SCIH do HU-UFSC por meio da plataforma *online* Neobiome (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil).

5.5 Análise estatística

A construção do banco de dados e a análise estatística foi realizada com o auxílio do software MedCalc Statistical Software versão 14.8.1 (Ostend, Belgium).

Para a análise descritiva dos dados, foram estimadas as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas. As frequências obtidas nas variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Foi considerado um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

A concordância entre os métodos microbiológicos e moleculares foi estimada pelo teste Kappa.

6 RESULTADOS

6.1 Comparação da identificação de espécies de bacilos Gram-negativos associados às IRAS obtidos por métodos com (DC) e sem o cultivo celular (NDC)

As amostras biológicas do ambiente hospitalar, de profissionais da saúde e de pacientes foram coletadas utilizando-se dois *swabs*, de forma simultânea ou subsequente: um *swab* de rayon com meio de transporte para cultivo (método DC) e isolamento de bacilos Gram-negativos e outro *swab* de algodão seco, para aplicação de técnicas não dependentes de cultivo (método NDC).

Utilizando-se a metodologia para as amostras DC, foi possível obter 390 isolados bacterianos. Para fins comparativos, o sistema Vitek[®]2 (GN Card) foi considerado o padrão ouro para identificação bacteriana. Para verificação do nível de concordância entre as diferentes abordagens utilizadas, foram escolhidos 235 isolados bacterianos pertencentes às principais e mais abundantes espécies associadas às IRAS, identificadas pelo sistema Vitek[®]2 e suas amostras NDC correspondentes: *A. baumannii* complex, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex e *E. coli*. Os isolados bacterianos e as amostras NDC foram submetidos à identificação por meio do sequenciamento de DNA (gene 16S rRNA região V3/V4), com o banco NeoRef DB.

Os resultados apresentados a seguir referem-se às seguintes comparações:

- Amostras DC identificadas ao nível específico pelo sistema Vitek[®]2 *versus* amostras DC identificadas ao nível específico pelo sequenciamento de DNA.
- Amostras DC identificadas ao nível específico pelo sistema Vitek[®]2 *versus* amostras NDC identificadas ao nível específico pelo sequenciamento de DNA.
- Amostras DC identificadas ao nível de gênero pelo sistema Vitek[®]2 *versus* amostras DC identificadas ao nível de gênero pelo sequenciamento de DNA.
- Amostras DC identificadas ao nível de gênero pelo sistema Vitek[®]2 *versus* amostras NDC identificadas ao nível de gênero pelo sequenciamento de DNA.

Na Tabela 3 podem ser visualizados os resultados obtidos para essas comparações, com respectivo coeficiente de concordância Kappa (intervalo de confiança de 95%).

Tabela 3. Concordância entre a identificação realizada pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 235 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).

DC versus DC		Vitek®2						
Espécie		Abc	Ecc	Ec	Kp	Pa	Outra	Total
16S rRNA V3/V4	Abc	41	0	0	0	0	0	41
	Ecc	0	23	0	0	0	0	23
	Ec	0	0	57	0	0	0	57
	Kp	0	0	0	53	0	0	53
	Pa	0	0	0	0	25	0	25
	Outra	8	26	0	2	0	0	36
	Total	49	49	57	55	25	0	235
Kappa		0,731						
IC 95%		0,650-0,811						
DC versus DC		Vitek®2						
Gênero		A	T	E	K	P	Outra	Total
16S rRNA V3/V4	A	48	0	0	0	0	0	48
	T	0	24	0	1	0	0	25
	E	0	0	57	0	0	0	57
	K	0	21	0	54	0	0	75
	P	1	0	0	0	25	0	26
	Outra	0	4	0	0	0	0	5
	Total	49	49	57	55	25	0	235
Kappa		0,776						
IC 95%		0,711-0,841						
DC versus NDC		Vitek®2						
Espécie		Abc	Ecc	Ec	Kp	Pa	Outra	Total
16S rRNA V3/V4	Abc	37	1	1	1	1	0	41
	Ecc	0	13	0	0	0	0	13
	Ec	0	3	42	7	1	0	53
	Kp	0	9	2	31	1	0	43
	Pa	0	0	0	1	21	0	22
	Outra	12	23	12	15	1	0	63
	Total	49	49	57	55	25	0	235
Kappa		0,529						
IC 95%		0,443-0,614						

DC versus NDC		Vitek®2						Total
Gênero		A	T	E	K	P	Outra	
16S rRNA V3/V4	A	45	2	1	2	2	0	52
	T	0	15	1	1	0	0	17
	E	0	3	42	7	1	0	53
	K	0	17	3	39	1	0	60
	P	3	3	1	4	21	0	32
	Outra	1	9	9	2	0	0	21
Total		49	49	57	55	25	0	235
Kappa		0,587						
IC 95%		0,501-0,674						

Abc e A: *Acinetobacter baumannii* complex e *Acinetobacter* spp.

Ecc e T: *Enterobacter cloacae* complex e *Enterobacter* spp.

Ec e E: *Escherichia coli* e *Escherichia* spp.

Kp e K: *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella* spp.

Pa e P: *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* spp.

IC: intervalo de confiança

A interpretação dos valores de Kappa seguiu os seguintes critérios (ALTMAN, 1991):

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

A identificação ao nível de espécie ou gênero dos isolados bacterianos (amostras DC) pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA mostraram boa concordância (0,731 e 0,776 respectivamente).

Quanto à identificação de *A. baumannii* complex por sequenciamento, observou-se oito casos de incongruência: um isolado foi identificado como *Pseudomonas fulva* e sete isolados foram identificados como *Acinetobacter soli* ou *Acinetobacter radioresistens* (não pertencentes ao complexo Abc) pela técnica de sequenciamento.

A identificação de *K. pneumoniae* por sequenciamento apresentou duas incongruências: um isolado identificado como *Klebsiella oxytoca* e um isolado identificado como *Enterobacter aerogenes*.

Para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* não foram identificadas incongruências entre os resultados obtidos pelos métodos de identificação analisados no presente estudo.

A identificação de *Enterobacter cloacae* complex foi a que apresentou o maior número de incongruências em relação aos diferentes

métodos analisados no presente estudo. Foram encontrados 25 casos de incongruência (51,0%), todos envolvendo espécies da família Enterobacteriaceae: um isolado foi identificado como *Enterobacter aerogenes*, quatro isolados foram identificados como *Salmonella enterica* e 21 isolados como *Klebsiella oxytoca* pela técnica de sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA. A identificação de *K. oxytoca*, em grande parte dos casos, ao invés de espécies do complexo *E. cloacae* demonstra que pode haver baixo poder discriminatório dessa região do gene 16S rRNA para identificação de *E. cloacae*.

A identificação ao nível de espécie ou gênero dos isolados bacterianos (amostras DC) em comparação às amostras NDC pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA mostraram concordância moderada (Kappa de 0,529 e 0,587, respectivamente). É importante ressaltar que as amostras NDC são amostras consideradas complexas, com maior abundância e diversidade de espécies bacterianas. Para fins comparativos, foram observadas as amostras NDC correspondentes aos isolados bacterianos (amostras DC), observando-se a presença ou ausência das espécies e gêneros bacterianos alvos da presente comparação. Assim, os resultados apresentados dizem respeito não somente à identificação, mas também à recuperação de espécies bacterianas de interesse clínico nessas amostras complexas.

Novamente, a maior quantidade de incongruências foi identificada para *E. cloacae* complex. Esses resultados reforçam a hipótese de baixo poder discriminatório da região V3/V4 do gene 16S rRNA para identificação de *E. cloacae*.

Após as observações relatadas, optou-se por analisar as concordâncias entre as identificações pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA em amostras DC e NDC com o mesmo grupo de bactérias de interesse clínico, excetuando-se *E. cloacae* complex, uma vez que esta espécie, isoladamente, influenciou negativamente os valores de concordância de Kappa, a fim de identificar o real nível de concordância para as demais espécies analisadas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 4 e Figuras 11 e 12.

Tabela 4. Concordância entre a identificação realizada pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).

DC versus DC		Vitek®2					
Espécie		Abc	Ec	Kp	Pa	Outra	Total
16S	Abc	41	0	0	0	0	41
	Ec	0	57	0	0	0	57
rRNA	Kp	0	0	53	0	0	53
	Pa	0	0	0	25	0	25
V3/V4	Outra	8	0	2	0	0	10
	Total	49	57	55	25	0	186
Kappa 0,898							
IC 95% 0,834-0,962							
DC versus DC		Vitek®2					
Gênero		A	E	K	P	Outra	Total
16S	A	48	0	0	0	0	48
	E	0	57	0	0	0	57
rRNA	K	0	0	54	0	0	54
	P	1	0	0	25	0	26
V3/V4	Outra	0	0	1	0	0	1
	Total	49	57	55	25	0	186
Kappa 0,979							
IC 95% 0,947-1,000							
DC versus NDC		Vitek®2					
Espécie		Abc	Ec	Kp	Pa	Outra	Total
16S	Abc	37	1	1	1	0	40
	Ec	0	42	7	1	0	50
rRNA	Kp	0	2	31	1	0	34
	Pa	0	0	1	21	0	22
V3/V4	Outra	12	12	15	1	0	40
	Total	49	57	55	25	0	186
Kappa 0,637							
IC 95% 0,545 0,729							
DC versus NDC		Vitek®2					
Gênero		A	E	K	P	Outra	Total
16S	A	45	1	2	2	0	50
	E	0	42	7	1	0	50
rRNA	K	0	3	39	1	0	43
	P	3	1	4	21	0	29
V3/V4	Outra	1	10	3	0	0	14
	Total	49	57	55	25	0	186
Kappa 0,733							
IC 95% 0,648 0,818							

Abc e A: *Acinetobacter baumannii* complex e *Acinetobacter* spp.
Ec e E: *Escherichia coli* e *Escherichia* spp.
Kp e K: *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella* spp.
Pa e P: *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* spp.
IC: intervalo de confiança

Ao analisar o grupo de bactérias que compreende apenas *A. baumannii* complex, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, a identificação ao nível de espécie ou gênero dos isolados bacterianos (amostras DC) pelo sistema Vitek[®]2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA mostraram melhora considerável, com excelente concordância (Kappa de 0,898 e 0,979 para nível de espécie e gênero respectivamente). Os resultados apresentados para essa segunda análise reforçam a hipóteses trazida para os casos de incongruência de identificação de *E. cloacae*, demonstrando que é necessário aprofundar os estudos para identificação correta e inequívoca dessa espécie bacteriana por métodos bioquímicos e genotípicos.

Para essa segunda análise, a concordância para a identificação ao nível de espécie ou gênero das amostras DC em comparação às amostras NDC também melhorou, mostrando boa concordância (Kappa de 0,637 e 0,733, respectivamente). Ao analisar as incongruências, de forma a compreendê-las, encontra-se um perfil, no qual amostras DC e NDC com características de menor complexidade (menor diversidade e maior abundância relativa de poucas espécies), como as amostras de pacientes, tem maior concordância entre si, enquanto amostras ambientais, de maior complexidade (maior diversidade e abundância relativa), apresentam menor concordância entre si. Esse perfil pode ser visualizado na Figura 13, na qual estão disponíveis as espécies associadas às IRAS mais comumente identificadas em *swabs* retais de pacientes e *swabs* das superfícies de alto contato das áreas de descanso dos profissionais de saúde nas abordagens DC (identificadas pelo Vitek[®]2) e NDC (identificadas por sequenciamento de DNA). Como esperado, pode-se observar que em alguns tipos de amostras, como as de superfície do ambiente hospitalar, há abundância de espécies não comumente (ou não facilmente) cultivadas pelos métodos tradicionais, o que explica, em parte, as incongruências entre as abordagens DC e NDC.

Figura 8. Abundâncias relativas para espécies e gêneros associados às IRAS mais comumente identificados pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC).

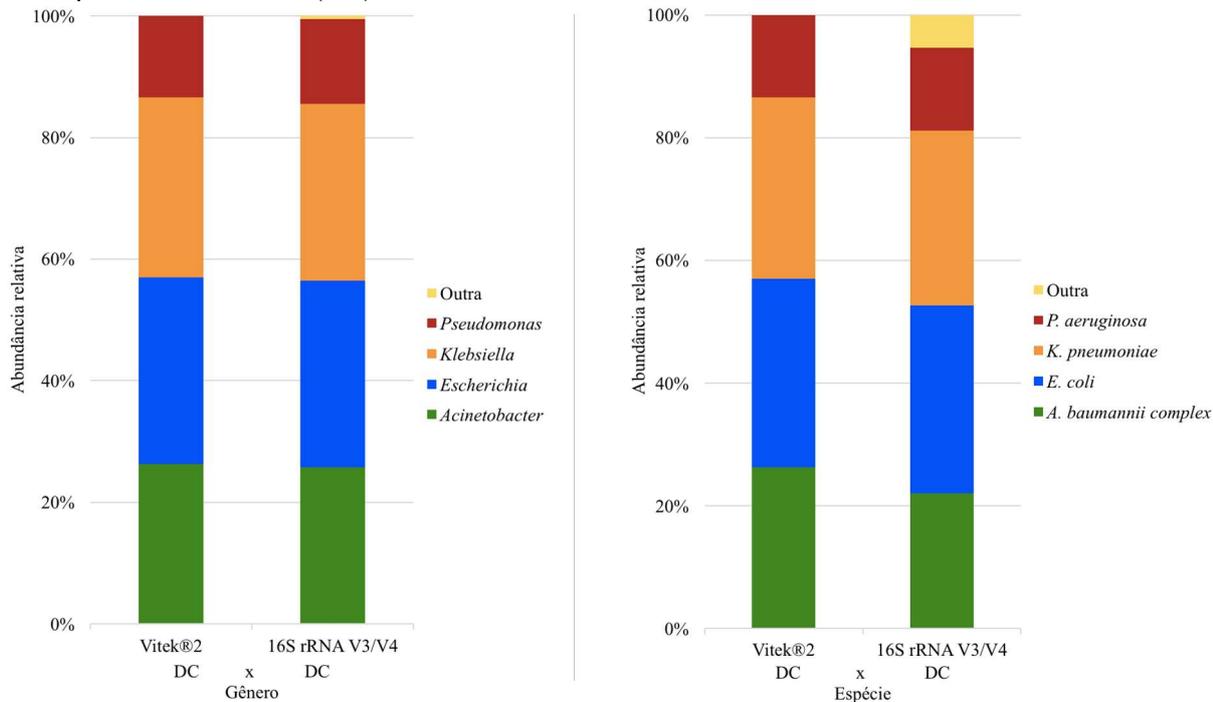


Figura 9. Abundâncias relativas para espécies e gêneros identificados pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em 186 amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).

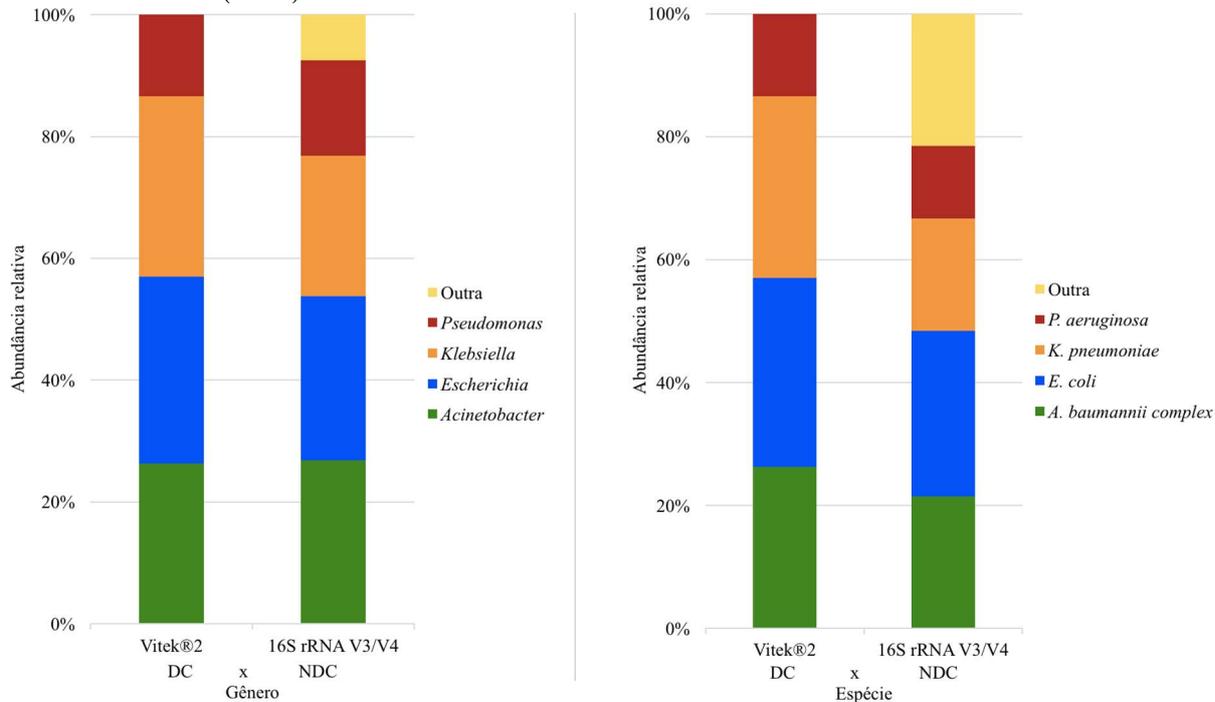
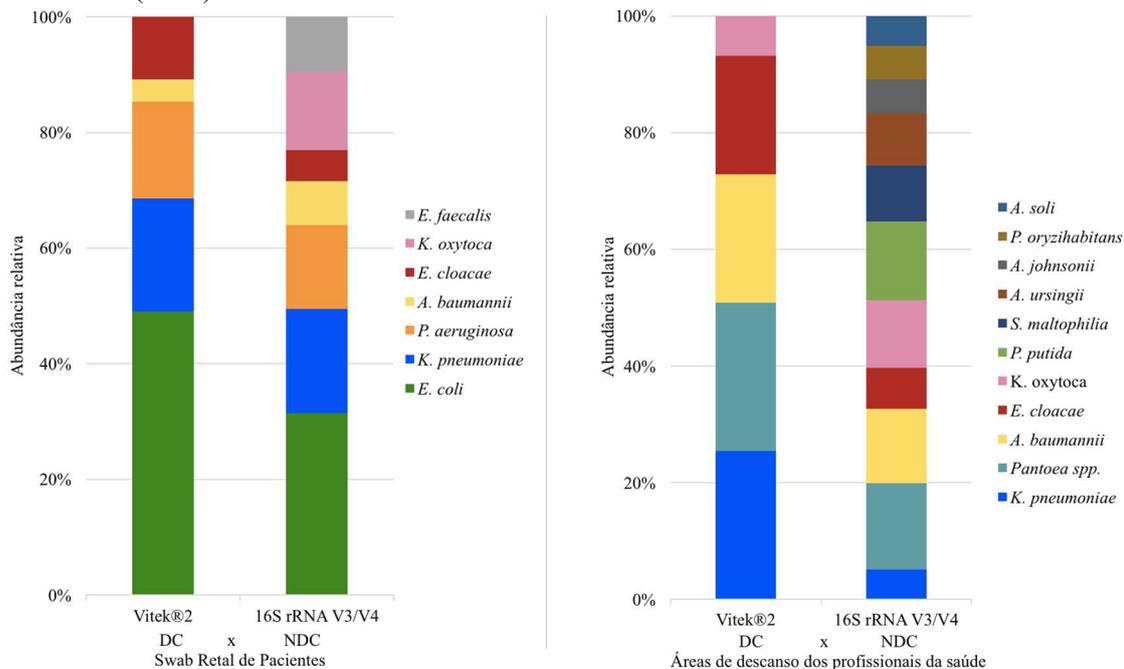


Figura 10. Abundâncias relativas para espécies identificadas pelo sistema Vitek®2 e pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA em *swabs* retais de pacientes e *swabs* das superfícies de alto contato das áreas de descanso dos profissionais da saúde, nas amostras dependentes de cultivo (DC) e não dependentes de cultivo (NDC).



6.2 Caracterização da resistência aos antimicrobianos em isolados de bacilos Gram-negativos associados às IRAS

O artigo científico referente ao presente item encontra-se em fase de revisão para submissão à revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ISSN 0066-4804, Qualis CAPES A1, fator de impacto 4,5).

Antimicrobial resistance profile of gram-negative bacteria related to healthcare associated infections: a six-month cross-sectional study.

Aline F. R. Sereia^{a,b*}, Patricia A. da Cunha^{a,b*}, Daniela C. Tartari^c, Caetana P. Zamparette^c, Diana A. Estigarribia^a, Taise C. R. Klein^d, Ivete Ioshiko Masukawa^d, Clarice I. Silva^d, Maria Luiza V. Vieira^d, Mara C. Scheffer^d, Dellyana R. Boberg^b, Luiz Felipe V. de Oliveira^b, Edmundo C. Grisard^a, Thaís C. M. Sincero^{c#}

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^a; Neoprospecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brazil^b; Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^c; Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^d.

*A.F.R.S. and P.A.C. contributed equally to this work.

Running Title: Antimicrobial resistance of HAI-related GN bacteria

#Corresponding author: Thaís C. M. Sincero, tsincero@gmail.com

Abstract

Healthcare-associated infections (HAI) are an important public health threat with the multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria (GNB) being of particular concern. Here we present the antimicrobial resistance profile of HAI-related GNB (HAIRB) obtained from samples of patients (PT), healthcare workers (HCW) and hospital environment and equipment (HE) in a six-months screening program. From the 180 sampling points distributed in five hospital units, a total of 1,080 swabs were collected allowing the isolation of 390 HAIRB: 197 from HE (50.5%), 166 from PT (42.6%) and 27 from HCW (6.9%). The most common HAIRB found were: *Escherichia coli* (14.6%), *Klebsiella pneumoniae* (14.1%), *Pantoea* spp. (14.1%), *Acinetobacter*

baumannii complex (12.6%), *Enterobacter cloacae* complex (12.6%) and *Pseudomonas aeruginosa* (6.4%). Among the HAIRB 32.6% were characterized as MDR, 17.7% as carbapenem resistant and 38.7% as extended-spectrum cephalosporins resistant. Carbapenem resistance was higher in *Acinetobacter* spp. (36.5%), followed by Enterobacteriaceae (14.5%) and *Pseudomonas* spp. (11.8%). Detection of β -lactamases-resistance genes were carried out via qPCR, which showed that *bla*_{KPC-like} and *bla*_{CTX-M-1} group were more prevalent in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* complex, while *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{SPM-like} were prevalent in *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, respectively. This study reveals that the spread of HAIRB within the hospital environment is higher than predicted, indicating that healthcare workers, hospital areas and equipment are key factors on MDR gram-negative bacteria dissemination and shows that an active surveillance program can be a powerful tool for the understanding and control of HAI.

Introduction

Healthcare-associated infections (HAI) are important public health threats requiring continuous monitoring and efficient surveillance programs (1). HAI caused by multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria (GNB) are of particular concern, with high-risk global alerts (2-4). HAI can seriously affect patient health, promoting long-term hospital stays and increasing the mortality, in addition to impose high costs for the healthcare system (5-7). There are many evidences that the hospital environment and the healthcare workers are key players on large-scale dissemination of MDR bacteria (8-11). Also, the combination of fast human mobility around the world with selection pressure by overuse and misuse of antibiotics in human and food-producing animals and the difficulties in adopting simple control measures form the perfect system to ensure the spread of MDR bacteria (12-14). In this sense, adoption of surveillance programs based on new technologies associated with the rational management of antimicrobials and the continuous training for healthcare workers can allow an effective control of HAI transmission, ensuring the patient safety and a consequent reducing of direct and indirect costs (5, 15-16).

To better understand the antimicrobial resistance profile and the dissemination of HAI-related GNB in the healthcare setting we carried out a six-months surveillance program targeting patients, healthcare workers and hospital environment.

Materials and Methods

Study design

The Healthcare-associated Infections Microbiome Project (HAIMP) was carried out at the Professor Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital of Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis/SC, Brazil). The UFSC Human Research Ethics Committee approved his project (number 32930514.0.0000.0121). Between April and September of 2015, a total of 1,080 samples were collected from patients (PT: rectal, nasal and hands swabs; n=198), healthcare workers (HCW: hands, cell phone and protective clothing; n=216) and hospital environment and equipment (HE: high-touch surfaces; n=666) (Table S1). These samples were collected monthly from 180 points distributed in five hospital units as follows: emergency ward (EMG), internal medicine ward (IMW), surgical ward (SUW), general surgery unit (GSU) and intensive care unit A and B (ICU-A and ICU-B). All participants were initially informed about the study aims and the collection of biological samples were carried out after signing a free, prior and informed consent. Samples collection dates were blind to the healthcare workers. The patients must have fulfilled the longer hospital stay criteria of inclusion. The samples were collected using Amies agar gel-containing swabs (Copan Inc., Italy) and stored at 4 °C until processing.

Phenotypic analyses

As this study focused on HAI-related gram-negative bacteria (GNB), the swab samples were inoculated in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, USA) and incubated for 12-18 hours at 36 °C (± 1 °C) prior plating on selective MacConkey agar plates (Becton, Dickinson and Company, USA), following incubation (18-24 hours) at the same temperature. Different morphotypes of Colony-Forming Units (CFU) were isolated and transferred onto new MacConkey agar plates following a new incubation (18-24 hours at 36 °C, ± 1 °C). Identification and antimicrobial susceptibility test (AST) of each isolate were performed using Vitek[®]2 (BioMérieux Inc., USA) GN ID and AST-N239 cards according to the manufacturer's instructions. All isolates were cryopreserved in liquid N₂ in BHI broth supplemented with 15% glycerol. Based on the AST results, the isolates were then classified as “not multidrug resistant” (Not MDR) or “multidrug resistant (MDR), according to the acquired resistance classification (17).

Following the standards of this classification, all *Pseudomonas* species were classified using the *Pseudomonas aeruginosa* criteria.

Genotypic analyses

DNA from all GNB isolates was obtained using a magnetic beads protocol (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil) and quantified using Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA). A panel of the most important β -lactamases genes for each species (Table S2) in the Brazilian scenario was tested by qPCR using specific primers and hydrolysis probes in a duplex or triplex configuration: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-2} group, *bla*_{CTX-M-8} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{CTX-M-25} group, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} and *bla*_{SPM-like}. The qPCR reactions were carried out in a 10 μ L final volume, containing 0.5 ng of DNA and 1X Master Mix (Cy5[®], HEX[™] and FAM[™] labeled probes; ROX[™] as passive reference; specific forward and reverse primers) (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). A negative reaction control and a positive control of each resistance gene (characterized strains containing the gene of interest) were included and the assays were carried out in triplicate. The qPCR amplifications were performed on an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the following thermal conditions: 95 °C for 10 min, 35 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. According to the pre-established threshold, samples with Cq \leq 33.0 were considered positive for the presence of the β -lactamases gene.

Some GNB samples were identified via high-throughput sequencing of 16S rRNA V3/V4 region (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil) for species confirmation purposes. The 16S rRNA libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc. San Diego, CA, USA) with the V2 kit, 300 Cycles, single-end sequencing.

Qui-square or Fisher's exact test were used for pairwise or proportions comparisons, with significance level set at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using MedCalc Statistical Software version 14.8.1 (Ostend, Belgium).

Results

Gram-negative bacteria (GNB) identification

Among the 1,080 samples collected during the six-month hospital screening, 25.5% (275) were positive for the presence of HAI-related

GNB, with statically significant differences between the samples sources ($P<0.0001$): 53.1% (146) were from hospital environment (HE), 37.5% (103) were from patients (PT) and 9.5% (26) were from healthcare workers (HCW). The highest incidence of positive samples for HAI-related GNB was found in the EMG (32.9%; 77/234), followed by SUW (30.1%; 47/156), ICU-B (25.8%; 51/198), IMW (24.1%; 39/162), ICU-A (23.7%; 44/186) and GSU (11.8%; 17/144); only GSU was statistically different from the other units ($P<0.05$) (Table S3).

We obtained 390 isolates from the HAI-related GNB positive samples: 197 were from HE (50.5%), 166 from PT (42.6%) and 27 from HCW (6.9%). The phenotypic identification by Vitek[®]2 (GN ID card) allowed the identification of 40 distinct species from 380 isolates (Table 1, Figure S1). Among these, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* spp., *Acinetobacter baumannii* complex and *Enterobacter cloacae* complex species were the most abundant, being found at similar frequencies. Identification by Vitek[®]2 GN ID card failed for 10 (2.6%) of the isolates.

Table 1. Phenotypic identification of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Phenotypic identification ^a	PT ^b		HE ^c		HCW ^d		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Escherichia coli</i>	53	31.9	3	1.52	1	3.7	57	14.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	14.5	29	14.72	2	7.4	55	14.1
<i>Pantoea</i> spp.	1	0.6	50	25.38	4	14.8	55	14.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	13	7.8	30	15.23	6	22.2	49	12.6
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	20	12.0	25	12.69	4	14.8	49	12.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	11.4	6	3.05	0	0.0	25	6.4
<i>Serratia marcescens</i>	9	5.4	5	2.54	1	3.7	15	3.8
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3	1.8	5	2.54	1	3.7	9	2.3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.6	6	3.05	0	0.0	7	1.8
<i>Proteus mirabilis</i>	5	3.0	2	1.02	0	0.0	7	1.8
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0.6	3	1.52	2	7.4	6	1.5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	0.0	6	3.05	0	0.0	6	1.5
Other								
Enterobacteriaceae ^e	12	7.2	10	5.08	3	11.1	26	6.7
Other <i>Acinetobacter</i> ^f	0	0.0	4	2.03	0	0.0	4	1.0
Other <i>Pseudomonas</i> ^g	0	0.0	2	1.02	0	0.0	2	0.5
Other ^h	3	1.8	5	2.54	1	3.7	9	2.3
NI	2	1.2	6	3.05	2	7.4	10	2.6
Total	166	42.6	197	50.5	27	6.9	390	100.0

^a Vitek[®]2, GN ID card, BioMérieux. ^b PT: Patients. The percentage (%) refers to the total of GNB isolated from PT samples. ^c HE: Hospital Environment and Equipment. The percentage (%) refers to the total of GNB isolated from HE samples. ^d HCW: Healthcare Workers. The percentage (%) refers to the total of GNB isolated from HCW samples. ^e *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter sedlakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris*, *Kluyvera intermedia*, *Proteus vulgaris* group/*Proteus penneri*, *Providencia stuartii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola*, *Serratia liquefaciens* group, *Serratia odorifera*, *Serratia rubidaea* and *Yersinia enterocolitica* group. ^f *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter radioresistens*. ^g *Pseudomonas luteola* and *Pseudomonas oryzihabitans*. ^h *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia* group, *Delftia acidovorans*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vibrio fluvialis*. NI: Not Identified.

Antimicrobial Susceptibility Test (AST)

Out of the 390 HAI-related GNB, the Vitek[®]2 AST card failed for 70 (17,9%) isolates (only 310 isolates could be analyzed, as presented identification and AST results).

The AST analyses allowed us to classify 32.6% (101/310) of the HAI-related GNB as multidrug resistant (MDR), with no statistically significant difference between the three sources: PT 42.0% (66/157), HE 23.9% (32/134) and HCW 15.8% (3/19). Resistance of GNB to carbapenems (meropenem, ertapenem or imipenem) was identified in 17.7% of the isolates, being significantly higher in PT (24.2%, $P=0.036$), followed by HCW (15.8%) and HE (10.4%). Resistance of GNB to extended-spectrum cephalosporins (cefepime, ceftazidime or ceftriaxone) was 38.7%, with no statistically significant differences between the sources: 35.0% for PT, 41.0% for HE and 52.6% for HCW (Figure 1). The distribution of MDR HAI-related GNB by each hospital unit (Figure 2, Table S3), revealed that ICU-B and SUW had the highest proportion, 57.1% (32/56) and 36.5% (19/52), respectively, followed by ICU-A with 30.9% (17/55), IMW with 29.3% (17/58) and EMG with 21.9% (16/73) (in GSU the MDR profile was not identified) ($P=0.0001$). The ICU-B also showed the highest prevalence of HAI-related GNB resistant to carbapenems, 44.6% (statistically different from the other units), followed by IMW with 20.7%, ICU-A with 16.4%, SUW with 7.7% and EMG with 6.8% ($P<0.0001$). Resistance to carbapenems was not detected in GNB isolated from GSU. Once again, resistance to extended-spectrum cephalosporins was higher in ICU-B with 60.7% and in IMW with 44.8%, followed by ICU-A with 36.4%, EMG with 31.5%, SUW with 26.9% and GSU with 18.8% ($p=0.0014$).

We separated the collected samples into groups (representing the areas of the hospital or the isolation sites) with the distribution of GNB and their resistance profile (Figure 3, Table S4). Analysis of this data allowed us to identify the critical points of contamination within the studied areas.

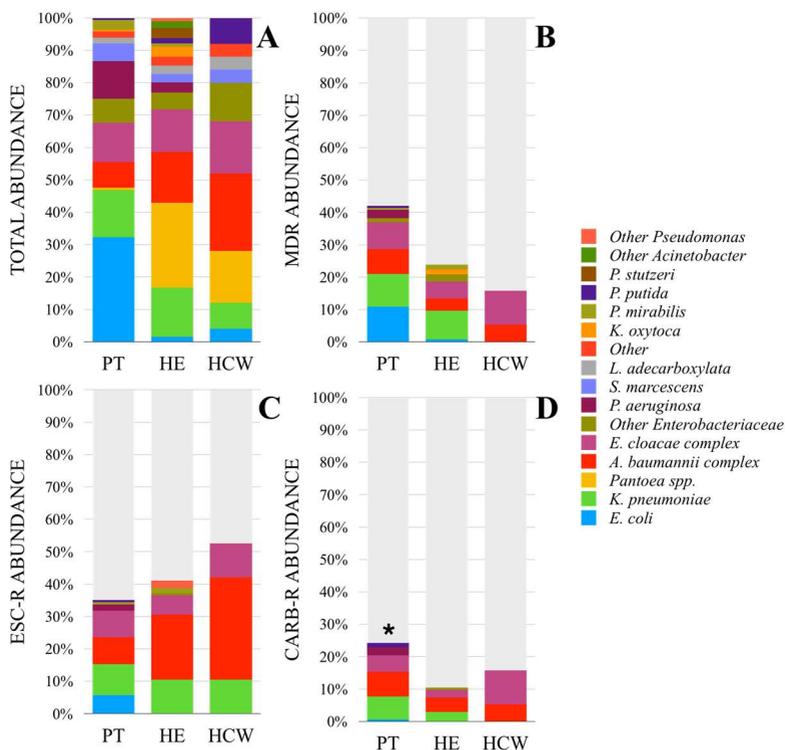


Figure 1. Abundance of Gram negative bacteria in patients (PT), hospital environment/equipment (HE) and healthcare workers (HCW) (N = 310). A: Total abundance. B: Proportion and abundance of MDR (Multidrug Resistant) bacteria, according to the Acquired Resistance Classification (17). C: Proportion and abundance of extended-spectrum cephalosporins resistant bacteria. D: Proportion and abundance of carbapenem resistant bacteria.

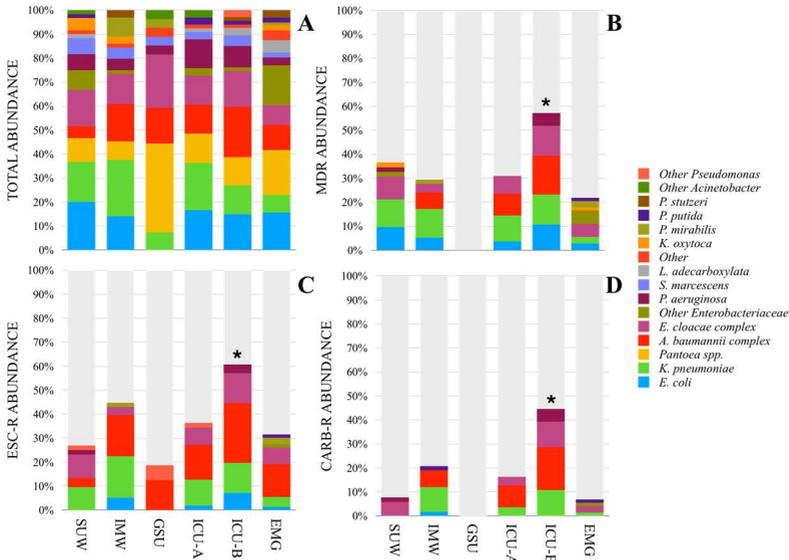


Figure 2. Abundance of Gram negative bacteria in the six hospital units - Surgical Ward (SUW), Internal Medicine Ward (IMW), General Surgery Unit (GSU), Intensive Care Unit A and B (ICU-A and ICU-B) and Emergency (EMG) (N = 310).

A: Total abundance. B: Proportion and abundance of MDR (Multidrug Resistant) bacteria, according to the Acquired Resistance Classification (17). C: Proportion and abundance of extended-spectrum cephalosporins resistant bacteria. D: Proportion and abundance of carbapenem resistant bacteria.

* Statistically significant differences

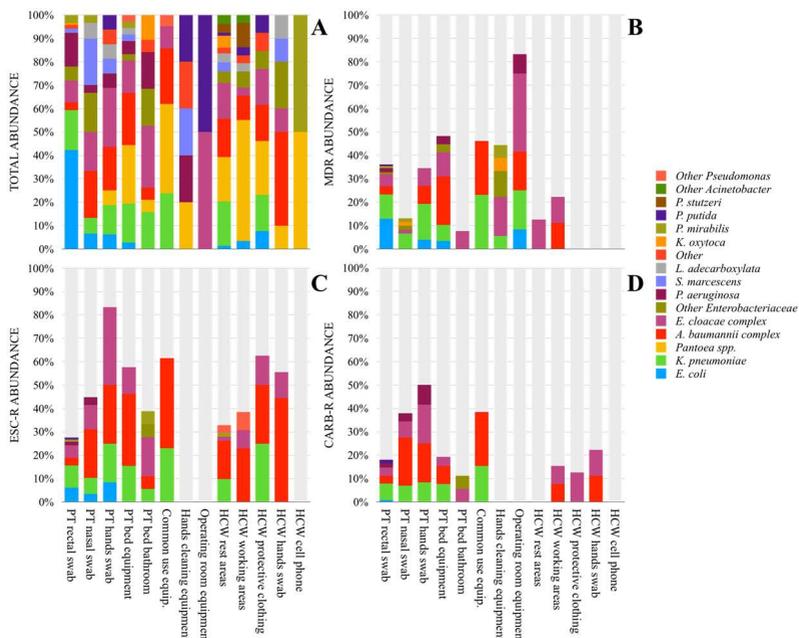


Figure 3. Abundance of Gram negative bacteria in the different areas of the hospital or the isolation sites (N = 310).

A: Total abundance. B: Proportion and abundance of MDR (Multidrug Resistant) bacteria, according to the Acquired Resistance Classification (17). C: Proportion and abundance of extended-spectrum cephalosporins resistant bacteria. D: Proportion and abundance of carbapenem resistant bacteria.

Characterization of the patients-related samples

During the sampling period, a total of 66 samples were collected from patients (PT) and their respective beds (HE samples) in all hospital units, except GSU. According to the medical records, the average age of the inpatients was 63.2 years, being 47.0% female and 53.0% male. The average length of hospital stay was 15.3 days and, unexpectedly, the longer hospitalization was seen for SUW patients, with 24.3 days, followed by IMW (23.4 days), ICU-B (15.0 days), ICU-A (10.4 days) and EMG (6.8 days). More than half of these patients (54.5%) were admitted to more than one unit of the hospital and 65.2% undergone at least one invasive procedure. Medical records also show that 50,0% of the patients did not present HAI during the current hospitalization, 43.9% had a HAI during the current hospitalization and 6,1% were colonized by HAI-related bacteria. The results of the present study

showed that 62 patients (93.9%) had at least one HAI-related GNB isolated from their samples and 63.6% of the patients had at least one MDR GNB, 39.4% had an extended-spectrum cephalosporin GNB and 28.8% had a carbapenem resistant GNB. From the patients with two or more sites colonized by HAI-related GNB (28/66 - 46.7%) we identified MDR GNB of same species in 42.9% of the cases, with 35.7% showing an AST very similar (equal MDR and carbapenem resistance classification). Correspondence of HAI-related GNB isolated from inpatients and from their beds was positive for 31 cases: 16.1% revealed to be the same GNB species with equal MDR and carbapenem resistance.

In order to precisely assess the antimicrobial resistance profile of the HAI-related GNB, results are now presented in separate topics addressing the Enterobacteriaceae (n=279), *Acinetobacter* spp. (n=53) and *Pseudomonas* spp. (n=39), totalizing 372 GNB isolates. From the original GNB isolates, 10 were not identified and eight did not fit in any of these above-mentioned groups.

Enterobacteriaceae

The most common Enterobacteriaceae (n=279) found (frequency higher than 5%) were *Escherichia coli* (20.4%), *Klebsiella pneumoniae* (19.7%) *Pantoea* spp. (19.4%), *Enterobacter cloacae* complex (17.5%) and *Serratia marcescens* (5.4%).

A total of 220 of the 279 Enterobacteriaceae presented results for the AST. AST results for the three most frequent species of HAI-related Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*) in PT, HE and HCW are presented in Tables 2, 3 and 4. Analysis of the antimicrobial resistance profiles did not show statistically significant differences among the different GNB sources (PT, HE and HCW) (Figure 4, Table S5). MDR profile was found in 35.0% of the Enterobacteriaceae, carbapenem resistance was present in 14.5% and extended-spectrum cephalosporins resistance was found in 30.9%. In PT, HE and HCW, MDR was found in 40.3% (50/124), 29.4% (25/85) and 18.2% (2/11) of the Enterobacteriaceae isolates, carbapenem resistance was identified in 17.7%, 9.4% and 18.2% and extended-spectrum cephalosporins resistance was present in 31.4%, 29.4% and 36.4%, respectively, with no statistically significant differences among the groups tested.

When the three most frequent species of Enterobacteriaceae were analyzed separately, in patients (PT) we found that MDR, carbapenem

resistance and extended-spectrum cephalosporins resistance for these species were, respectively, 66.7%, 45.8% and 62.5% for *Klebsiella pneumoniae* (n=24), 65.0%, 40.0% and 65.0% for *Enterobacter cloacae* complex (n=20) and 32.1%, 1.9% and 17.0% for *Escherichia coli* (n=53). For hospital environment (HE) samples, *K. pneumoniae* (n=29) and *E. cloacae* complex (n=25) were classified as MDR in 41.4% and 28.0% of the cases, respectively, 13.8% and 12.0% were carbapenem resistant and 48.3% and 32.0% presented resistance to extended-spectrum cephalosporins. We found a worrying case of a IMW patient colonized by MDR (carbapenem and extended-spectrum cephalosporins resistant) *K. pneumoniae* in the three isolations sites (rectal swab, hands and nasal). In healthcare workers (HCW) samples we found two *K. pneumoniae*, three *E. cloacae* complex and one *E. coli*, being the two *E. cloacae* complex isolates MDR and resistant to carbapenems.

Frequencies of resistance genes detected by qPCR in HAI-related Enterobacteriaceae from PT, HE and HCW are presented in Figure 5 as a heat map, emphasizing the most important GNB of the family (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex and *E. coli*) (Table S6 shows resistance genes frequencies with the respective Cq mean). The *bla*_{KPC-like} gene was found in 5.9% (13/220) of Enterobacteriaceae, all of them resistant to carbapenems and identified as *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex or *Escherichia coli*. In another Enterobacteriaceae species resistant to carbapenems we did not find *bla*_{KPC-like} or other gene encoding carbapenemase tested. *Klebsiella pneumoniae* recovered from PT (n=24) presented concern beta-lactamase genes frequencies: 91.7% for *bla*_{SHV-like}, 37.5% for *bla*_{CTX-M-1} group, 33.3% for *bla*_{KPC-like}, 25.0% for *bla*_{CTX-M-9} group and 16.7% for *bla*_{CTX-M-8} group (some of these *K. pneumoniae* harboring three or more beta-lactamase genes).

Table 2. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=24)		HE (n=29)		HCW (n=2)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Aminoglycosides	Amikacin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	20.8	79.2	27.6	72.4	0.0	100.0
Penicillins	Ampicillin	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Ampicillin/Sulbactam	66.7	33.3	41.4	58.6	0.0	100.0
Cephameycins	Cefoxitin	54.2	45.8	17.2	82.8	0.0	100.0
Extended-spectrum cephalosporins	Cefepime	62.5	37.5	34.5	65.5	0.0	100.0
	Ceftazidime	58.3	41.7	27.6	72.4	100.0	0.0
	Ceftriaxone	62.5	37.5	48.3	51.7	100.0	0.0
Non-extended-spectrum cephalosporins	Cefuroxime	66.7	33.3	48.3	51.7	100.0	0.0
	Cefuroxime Axetil	66.7	33.3	48.3	51.7	100.0	0.0
	Ciprofloxacin	58.3	41.7	17.2	82.8	0.0	100.0
Polymyxins	Colistin	4.2	95.8	0.0	100.0	0.0	100.0
	Ertapenem	45.8	54.2	13.8	86.2	0.0	100.0
Carbapenems	Imipenem	41.7	58.3	10.3	89.7	0.0	100.0
	Meropenem	41.7	58.3	10.3	89.7	0.0	100.0
Antipseudomonal Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Piperacillin/Tazobactam	58.3	41.7	24.1	75.9	0.0	100.0
Glycylcyclines	Tigecycline	50.0	50.0	24.1	75.9	0.0	100.0

Table 3. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Enterobacter cloacae* isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=20)		HE (n=25)		HCW (n=4)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Aminoglycosides	Amikacin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	50.0	50.0	24.0	76.0	50.0	50.0
Penicillins	Ampicillin	100.0	0.0	88.0	12.0	75.0	25.0
Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Ampicillin/Sulbactam	100.0	0.0	88.0	12.0	75.0	25.0
Cephamycins	Cefoxitin	100.0	0.0	96.0	4.0	100.0	0.0
	Cefepime	65.0	35.0	28.0	72.0	50.0	50.0
Extended-spectrum cephalosporins	Ceftazidime	65.0	35.0	32.0	68.0	50.0	50.0
	Ceftriaxone	65.0	35.0	28.0	72.0	50.0	50.0
Non-extended-spectrum cephalosporins	Cefuroxime	85.0	15.0	36.0	64.0	75.0	25.0
	Cefuroxime Axetil	100.0	0.0	88.0	12.0	100.0	0.0
Polymyxins	Ciprofloxacin	60.0	40.0	24.0	76.0	50.0	50.0
	Colistin	10.0	90.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Carbapenems	Ertapenem	40.0	60.0	12.0	88.0	50.0	50.0
	Imipenem	25.0	75.0	12.0	88.0	0.0	100.0
	Meropenem	25.0	75.0	8.0	92.0	0.0	100.0
Antipseudomonal Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Piperacillin/Tazobactam	60.0	40.0	24.0	76.0	50.0	50.0
Glycylcyclines	Tigecycline	60.0	40.0	32.0	68.0	50.0	50.0

Table 4. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Escherichia coli* isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=53)		HE (n=3)		HCW (n=1)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Aminoglycosides	Amikacin	0.00	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	10.2	89.1	0.0	100.0	0.0	100.0
Penicillins	Ampicillin	42.9	57.1	66.7	33.3	0.0	100.0
Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Ampicillin/Sulbactam	36.7	63.3	33.3	66.7	0.0	100.0
Cephameycins	Cefoxitin	4.1	95.9	33.3	66.7	0.0	100.0
Extended-spectrum cephalosporins	Cefepime	16.3	83.7	0.0	100.0	0.0	100.0
	Ceftazidime	12.2	87.7	0.0	100.0	0.0	100.0
	Ceftriaxone	18.4	81.6	0.0	100.0	0.0	100.0
Non-extended-spectrum cephalosporins	Cefuroxime	20.4	79.6	33.3	66.7	0.0	100.0
	Cefuroxime Axetil	20.4	79.6	33.3	66.7	0.0	100.0
	Ciprofloxacin	28.6	71.4	33.3	66.7	0.0	100.0
Polymyxins	Colistin	2.0	98.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Ertapenem	2.0	98.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Carbapenems	Imipenem	0.00	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Meropenem	0.00	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Piperacillin/Tazobactam	16.3	83.7	0.0	100.0	0.0	100.0
Glycylcyclines	Tigecycline	0.00	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0

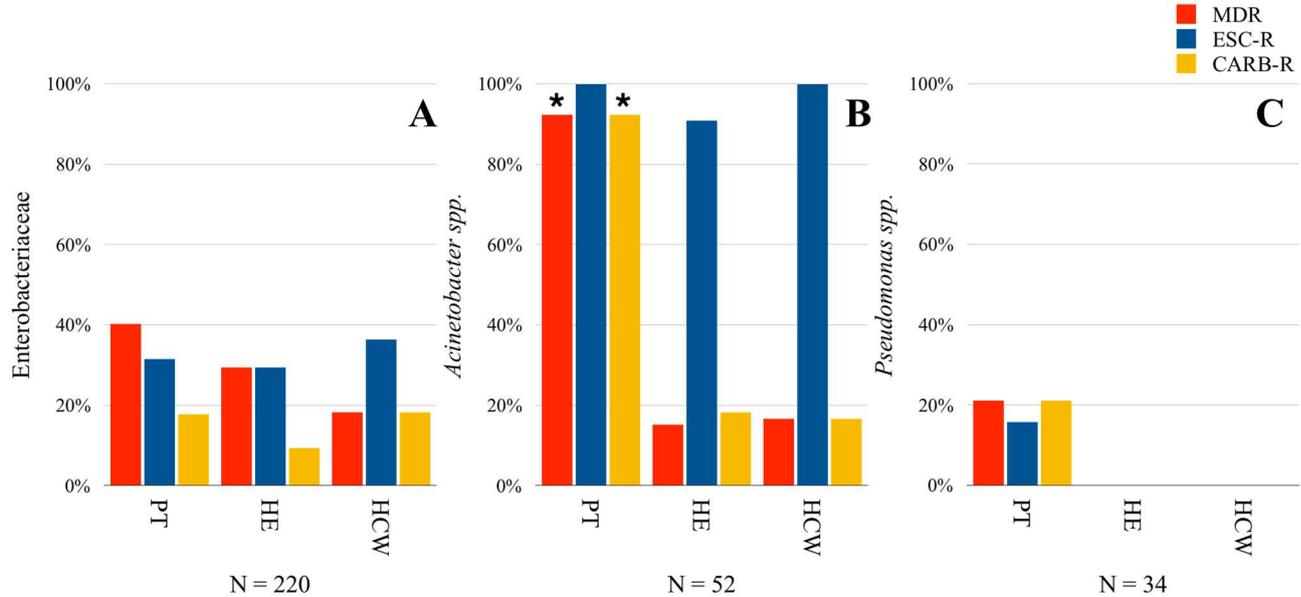


Figure 4. Proportion of MDR (multidrug resistant), ESC-R (extended-spectrum cephalosporins resistant) bacteria and carbapenem resistant bacteria in patients (PT), hospital environment/equipment (HE) and healthcare workers (HCW). A: Proportions for Enterobacteriaceae; B: Proportions for Acinetobacter spp.; C: Proportions for Pseudomonas spp. *Statistically significant differences

***Acinetobacter* spp.**

Using the phenotypic identification, we found that 92.5% (49/53) were *Acinetobacter baumannii* complex, 5.7% (3/53) were *Acinetobacter hwoffii* and 1.9% (1/53) *Acinetobacter radioresistens*.

Table 5 shows the phenotypic antimicrobial resistance profile of 52 HAI-related *Acinetobacter* spp. in PT, HE and HCW (Table S7 shows AST results for *Acinetobacter baumannii* complex separately). For *Acinetobacter* spp. the highest resistance to antimicrobials was seen in PT (Figure 4, Table S5): 92.3% (12/13) were MDR and resistant to carbapenems (imipenem or meropenem). The *bla*_{OXA-23-like} gene, which confers resistance to carbapenems, was identified at the same frequency (92.3%) (Figure 5). In HE and HCW carbapenem resistance were lower, 18.2% (6/33) and 16.7% (1/6) respectively. When PT, HE and HCW were analyzed together *Acinetobacter* spp. still showed the highest carbapenem resistance of all HAI-related GNB: 36.5%. MDR profile was found in 34.6% of *Acinetobacter* spp.: 92.3% (12/13) in PT, 15.2% (5/33) in HE and 16.7% (1/6) in HCW. The carbapenems resistance and MDR profiles were statistically significant different when we compare PT with HE or HCW ($P < 0.0001$). Extended-spectrum cephalosporins resistance (cefepine, ceftazidime or ceftriaxone) was found in 100%, 90.9% and 100% of PT, HE and HCW respectively (Figure 4).

Figure 5 shows the frequencies of beta-lactamase genes detected by qPCR in HAI-related *Acinetobacter* spp. from PT, HE and HCW, with *A. baumannii* complex analyzed separately (Table S6). In *A. baumannii* complex (n=49) the *bla*_{OXA-23-like} was found in 40.8% of the isolates and, interestingly, *bla*_{OXA-51-like} (intrinsic in *A. baumannii*) was found only in 53.1. Because of this unexpected observation, all *Acinetobacter* spp. were identified by high-throughput sequencing of V3/V4 region of the 16S rRNA for species confirmation. The isolates identified as *A. baumannii* complex by Vitek®2, GN ID card, with no detection of *bla*_{OXA-51-like} gene (n=23), were identified by 16S rRNA sequencing as *A. baumannii* (1), *A. calcoaceticus* (7) and *A. pittii*, *A. soli* or *A. nosocomialis* (15), which explains the absence of the gene in most of the cases.

Table 5. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Acinetobacter* spp. isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=13)		HE (n=33 ^a)		HCW (n=6)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Penicillins+β-lactamase inhibitors	Ampicillin/Sulbactam	84.6	15.4	18.2	81.8	16.7	83.3
Aminoglycosides	Amikacin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	46.2	53.8	9.1	90.9	16.7	83.3
	Cefepime	92.3	7.7	21.2	78.8	16.7	83.3
Extended-spectrum cephalosporins	Ceftazidime	92.3	7.7	21.2	78.8	33.3	66.7
	Ceftriaxone	100.0	0.0	90.9	9.1	100.0	0.0
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	92.3	7.7	18.2	81.8	16.7	83.3
Polymyxins	Colistin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	92.3	7.7	18.2	81.8	16.7	83.3
	Meropenem	92.3	7.7	18.2	81.8	16.7	83.3
Penicillins *	Ampicillin	100.0	0.0	93.9	6.1	100.0	0.0
Non-extended spectrum cephalosporins *	Cefuroxime	100.0	0.0	93.9	6.1	100.0	0.0
	Cefuroxime Axetil	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Cephameycins *	Cefoxitin	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Glycylcyclines *	Tigecycline	7.7	92.3	0.0	100.0	0.0	100

^a HE *Acinetobacter* spp. without AST (AST-N239 card failed) = 1 (*Acinetobacter radioresistens*). Total HE *Acinetobacter* spp. = 34.

*Classes/antibiotics tested in AST-N239 card (Vitek[®]2, BioMérieux) but that were not used for the Acquired Resistance Classification.

***Pseudomonas* spp.**

For *Pseudomonas* spp. isolated in the survey (n=39), 64.1% were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, 15.4% were *Pseudomonas putida*, 15.4% were *Pseudomonas stutzeri* and 5.2% were *Pseudomonas luteola* or *Pseudomonas oryzihabitans*.

AST profile of HAI-related *Pseudomonas* spp. from PT and HE can be verified in Table 6 (Table S8 shows AST results for *Pseudomonas aeruginosa* separately). This GNB group presented the more susceptible antimicrobial profiles, with resistance to important classes, like carbapenems and antipseudomonal cephalosporins (cefepine or ceftazidime), identified only in PT *Pseudomonas* spp. (n=19): 21.1% and 15.8%, respectively. The acquired resistance classification showed that 15.8% of *Pseudomonas* spp. in PT were MDR (Figure 4, Table S5) and presented the *bla*_{SPM-like} gene, that classically confers resistance to carbapenems (Figure 5, Table S6). All *Pseudomonas* spp. were 100% susceptible to Colistin.

Antimicrobial resistant profiles (MDR or carbapenem resistance) and *bla*_{SPM-like} were found only in *Pseudomonas aeruginosa* and is important to point out that three of them were isolated from the same ICU patient (one *P. aeruginosa* for each isolation site - hand, nasal and rectal swabs).

Table 6. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Pseudomonas* spp. isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=19 ^a)		HE (n=14 ^b)		HCW (n=1 ^c)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Aminoglycosides	Amikacin	26.3	73.7	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	26.3	73.7	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal cephalosporins	Cefepime	15.8	84.2	0.0	100.0	0.0	100.0
	Ceftazidime	15.8	84.2	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	26.3	73.7	0.0	100.0	0.0	100.0
Polymyxins	Colistin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal Carbapenems	Imipenem	26.3	73.7	0.0	100.0	0.0	100.0
	Meropenem	21.1	78.9	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Piperacillin/Tazobactam	15.8	84.2	14.3	85.7	0.0	100.0
Penicillins *	Ampicillin	100.0	0.0	64.3	35.7	100.0	0.0
Penicillins + β -lactamase inhibitors *	Ampicillin/Sulbactam	100.0	0.0	57.1	42.9	100.0	0.0
Cephamycins *	Cefoxitin	100.0	0.0	92.9	7.1	100.0	0.0
Non-extended spectrum cephalosporins *	Cefuroxime Axetil	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Extended-spectrum cephalosporins *	Ceftriaxone	100.0	0.0	57.1	42.9	100.0	0.0
Glycylcyclines *	Tigecycline	100.0	0.0	50.0	50.0	100.0	0.0

^aPT *Pseudomonas* spp. without AST (AST-N239 card failed) = 1 (*Pseudomonas putida*). Total PT *Pseudomonas* spp. (PT) = 20. HE *Pseudomonas* spp. without AST (AST-N239 card failed) = 3 (*Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*). Total HE *Pseudomonas* spp. = 17. ^cHCW *Pseudomonas* spp. without AST (AST-N239 card failed) = 1 (*Pseudomonas putida*). Total HCW *Pseudomonas* spp. = 2

*Classes/antibiotics tested in AST-N239 card (Vitek[®]2, BioMérieux) but that were not used for the Acquired Resistance Classification.

100%																												Resistance gene frequency																												0%																											
Enterobacteriaceae ^a														Acinetobacter spp. ^e														Pseudomonas spp. ^g																																																							
<i>K. pneumoniae</i> ^b				<i>E. cloacae</i> ^c				<i>E. coli</i> ^d						<i>A. baumannii</i> ^f				<i>P. aeruginosa</i> ^h																																																																	
PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT	PT	HE	HW	TT																																																				
<i>bla</i> _{CTX-M-1} _{group}	37.5	13.8	0	23.6	25.0	16.0	25.0	20.4	3.8	0	0	0	3.5	12.9	14.1	9.1	13.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{CTX-M-2} _{group}	0	0	0	0	0	0	0	0	1.9	0	0	0	1.8	0.8	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{CTX-M-8} _{group}	16.7	24.1	0	20.0	0	12.0	0	6.1	7.5	33.3	0	0	8.8	6.5	18.8	0	10.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{CTX-M-9} _{group}	25.0	3.4	0	12.7	25.0	4.0	0	12.2	0	0	0	0	8.9	2.4	0	0	5.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{CTX-M-25} _{group}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{KPC-like}	33.3	10.3	0	20.0	0	4.0	0	2.0	1.9	0	0	0	1.8	7.3	4.7	0	5.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{SHV-like}	91.7	72.4	100	81.8	10.0	8.0	0	8.2	5.7	0	0	0	5.3	21.8	29.4	18.2	24.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{SPM-like}	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	15.8	0	0	0	12.0	15.8	0	0	8.8	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{GES-like}	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{NDM-like}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		
<i>bla</i> _{IMP-like}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																		

Discussion

In developing countries, the risk of acquiring HAI is high, reaching up to 27%. The fight to improve patient safety is difficult because of the increasing antimicrobial resistance rates, coupled to other serious health systems problems and to the fact that health authorities are not sufficiently prepared to face the problem (18-19). Gram-negative bacteria (GNB) present a good performance against the antibiotics, making them a leading cause of HAI and a matter of great concern for the currently available therapies (20). In this context, Brazil has major challenges to detect and control antimicrobial resistance, once surveillance systems are quite inefficient, especially in southern and southeastern regions, where this problem seems to be more relevant because of the high concentration of healthcare services (21).

Here, we presented the first results for culture-dependent samples of the Healthcare-associated Infections Microbiome Project (HAIMP) that has been carried out in a teaching hospital in Southern Brazil. During six months, patients (PT), healthcare workers (HCW) and hospital environment (HE) were monitored using swab samples for the screening of HAI-related gram-negative bacteria (GNB).

Once there are many evidences that the environment has an important role in the HAI transmission (9, 22, 23), some special criteria were considered in the surveillance design. We look up critical areas in the hospital, called “high touch surfaces” (24): around the patients (like the medical equipment of the patient’s room), workstations of the healthcare workers (e.g. the nurse station and the area of medication preparation) or rest areas (lunch and sleep room). The patient who agreed to participate of the survey had his room selected for the sample collection, so it would be possible to correlate the samples. The patients not necessarily had infection or colonization, once the criteria for selection was the longer hospital stay, recognized as an important risk factor for acquiring HAI (25-26). The selection criteria for healthcare workers was that they should work exclusively or most of the time in the participating hospital unit where they were allocated (8). Three isolation sites were chosen for patients and healthcare workers, in order to allow the contamination correlation between them and the hospital environment.

A total of 390 GNB were isolated during the surveillance program (10 GNB were not identified by Vitek[®]2). Seven species/genus (or species complex) accounted for 80% (304/380) of the total GNB identified, almost of them classically identified in healthcare samples, like *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex and

Acinetobacter baumannii complex, in accordance with previous studies (27-30). In this GNB group, an unexpected result was the *Pantoea* spp., the third most frequent GNB, that was isolated mainly from HE samples and rarely in HCW. *Pantoea* spp. rarely causes opportunistic infections (31) and in the present study it was not identified in PT samples, which indicates a less important role in the HAI occurrence. However, some authors point out the problem of misidentification of the genus *Pantoea*. In a recent publication, Pillonetto *et al.* (32) described isolates previously identified as *Pantoea agglomerans* from outbreak events in Brazil as belonging to the genus *Phytobacter*. Draws attention the reported acquisition of resistance genes, such as *bla_{KPC}*, by this bacteria (33), which could be reviewed. The AST (Vitek[®]2, AST-N239) failed for 18.4% of the identified GNB (70/380). This high failure rate was mainly due to *Pantoea* spp., which had no AST performed.

From the total swabs collected, we observe that samples from PT, HE and HCW had different frequencies of GNB. There is a higher contamination rate of the patients and hospital environment with HAI-related GNB, than for healthcare workers ($P < 0.0001$). In our study, more than 90% of the patients presented a HAI-related GNB and we identified several cases of contamination of the patient room by the same GNB specie with similar or equal resistance profile, indicating a cross contamination, which demonstrate the importance of the hospital environment in the HAI dissemination (11, 34-37). Almost half of the patients presented positive results for GNB in more than one isolation site. Rectal swab was the site with the highest positivity, followed by nasal and hands swabs. However, GNB from nasal and hands swabs had relatively higher resistance rates than GNB from rectal swabs, probably due to different composition of bacterial populations (38), making them more likely to be colonized by MDR GNB. Nasal colonization studies usually emphasize gram-positive bacteria (39, 40), however it is important to highlight the high contamination rate by GNB identified in nasal swab samples of this survey: 23 of 66 participating patients had a GNB for this collection site, some of them MDR and resistant to carbapenems.

We found that 32.6% of the HAI-related GNB were MDR and no statistically significant differences were seen for PT (47.7%), HE (29.1%) and HCW (26.3%). Brazilian studies found MDR profile for GNB isolated from patients ranged from 32% to 48% (41, 42).

In the present study, resistance to carbapenems and to extended-spectrum cephalosporins was identified, respectively, in 17.7% and

38.7% of the total GNB (24.2% and 35.0% for PT). Over a decade, Brazilian and Latin American studies, that include the same GNB species identified in the present study, reported very variable rates for carbapenem resistance in patient-related samples, however a similarity with the present study is seen if the average MDR reported from the literature is considered: 31.7% (28-30, 43-49). The same pattern of similarity is observed for the extended-spectrum cephalosporins resistance or ESBL profile, considering the average reported from the literature of 31.0% (27-29, 44, 50-52) (all studies were conducted with GNB isolated from patients samples only).

The results presented for hospital environment and equipment, allow us to identify critical points of contamination. The most unexpected and worrying results were found for the rest areas of the healthcare workers, like the lunch and the sleeping rooms, which were only behind of the rectal swabs in number of isolated GNB, with positive results for MDR classification. The common work areas of the healthcare workers and hospital medical equipment in common use were also critical points of contamination, many of them contaminated with GNB resistant to carbapenems. We identified five cases (four from hands e one from protective clothes) of healthcare workers contamination with MDR GNB, three of them resistant to carbapenems.

The units of the hospital included in this survey did not show frequencies of HAI-related GNB statistically different from each other, except from GSU that, as expected, showed a low frequency of GNB. This result indicates that the contamination by this bacterial group is a systematic problem in the hospital, with similar contamination rates among the different units. Although particular results were found for the units included in this surveillance program and despite of the differences found in GNB contamination rates, in general, PT, HE and HCW did not show significant differences in the resistance profile, which signals a homogeneous spread of resistant GNB through the institution.

ICU-B had the most concerning results for the antimicrobial profile of HAI-related GNB, with the highest frequencies of MDR, carbapenem and extended-spectrum cephalosporins resistance, compared to the others units ($P < 0.05$), which confirms the existence of an increased incidence of resistant HAI-related GNB in this unit. Rubio *et al.* (27) had also found a significant difference between MDR GNB isolated from ICU patients and non-ICU patients. A possible explanation for this observation is that the ICU-B is an adult ICU that receives critically ill

patients, with longer length of stay, which exposes patients, healthcare workers and the environment to an increased chance of contamination by multi-resistant microorganisms. As expected, after the ICU-B, IMW and ICU-A showed the highest carbapenems and extended-spectrum cephalosporins resistance rates. However, a worrisome result was found in SUW, with higher incidence of GNB classified as MDR than in ICU-A and IMW. IMW is used by the hospital as an isolation unit that receives almost exclusively patients with colonization or infection by MDR GNB. SUW receives patients who are waiting for elective surgeries and post-surgical patients. Usually, this type of unit should have a shorter hospital stay, however, in fact, in the present study patients from SUW showed the longest average hospital stay, which helps to explain the higher incidence of GNB classified as MDR. In addition, another important factor is the high patients turnover rate among the hospital units and the lack of an efficient surveillance program, which reinforces the problem of HAI-related GNB spread. As SUW presented lower rates of carbapenem and extended-spectrum cephalosporins resistance compared to IMW and ICU-A, the classification of GNB in SUW as MDR is given mainly by other classes of antibiotics.

Enterobacteriaceae showed the most homogeneous results for PT, HE and HCW, with very similar resistance profiles among the three tested groups. The profile identified in Enterobacteriaceae shows once again the systematically spread of GNB occurring in patients, healthcare workers and environment. Within the most important species of the family, *Escherichia coli* presented a more susceptible antimicrobial profile and *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* complex presented the opposite, with the highest rates of MDR and carbapenem resistance. The AST profile identified here for *E. coli* was very similar to previous studies (44-45). However, we identified some differences when we compare the AST profile of *K. pneumoniae* and *E. cloacae*. The AST presented by Jones *et al.* (44) and by Gales *et al.* (46) for *Klebsiella* spp. isolated from patients with HAI are very similar to the AST identified in the present study for *K. pneumoniae* isolated from environment and healthcare workers. However, when we compare the AST results of *K. pneumoniae* isolated from patients in the present study we found higher resistance rates for imipenem, meropenem, extended-spectrum cephalosporins (cefepime, ceftazidime and ceftriaxone) and tigecycline (44, 46) than these previous reports. The results for carbapenem resistance are of particular concern: Gales *et al.* (46)

reported a resistance rate of 11.3% for imipenem and 11.1% for meropenem, Jones *et al.* (44) reported 7.9% for meropenem, while in the present study we found 41.7% of *K. pneumoniae* isolates from patients resistant to both carbapenems.

For *E. cloacae* complex we found a similar scenario: in the present study, the isolates from patients had higher resistance rates than reported in literature (44, 46) for extended-spectrum cephalosporins (cefepime, ceftazidime and ceftriaxone), carbapenems, and also for piperacillin/tazobactam, gentamicin and tigecycline. On the other hand, the isolates of *E. cloacae* complex from environment and healthcare workers showed more similar AST profile compared to previous studies from Brazil (46) and Latin American nations (44). The most discrepant resistance rates were found for tigecycline and piperacillin/tazobactam: Jones *et al.* (44) did not find *Enterobacter* spp. resistant to tigecycline and found that 10.7% were resistant to piperacillin/tazobactam, while we identified a 60.0% resistance rate for these both broad-spectrum antibiotics. Gales *et al.* (46) found imipenem and meropenem resistance in 7.5% and 1.5% for *Enterobacter* spp., respectively, while we found that 25.0% of *E. cloacae* complex isolated from patients were resistant to both carbapenems.

It is important to emphasize that the study presented here includes GNB isolated from patients with infection or colonization, as well as from the environment and healthcare workers, which further draws attention to the higher resistance rates that were found.

These two species, *K. pneumoniae* and *E. cloacae*, contributed to increase the frequencies of beta-lactamase genes in Enterobacteriaceae, which is in accordance with the phenotypic findings. The identification of two or more resistance genes in the same *K. pneumoniae* or *E. cloacae* complex isolate helps to understand the high rates of MDR that were found.

The *bla*_{SHV-like} shows the highest frequencies of all resistance genes tested, reaching up 91.7% for *K. pneumoniae* isolated from patients, and the frequencies found (in Enterobacteriaceae or specific species) are in accordance with previous studies (53-57). The *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-8} and *bla*_{CTX-M-9} groups were the most frequent of the CTX-M family genes. These findings were similar to several Brazilian studies (33, 53, 55, 58, 59), except from Peirano *et al.* (60) and Seki *et al.* (61) that found a higher frequency of *bla*_{CTX-M-1} group (64.0% and 55.9%, respectively). The *bla*_{CTX-M-2} was identified with lower frequencies and only in *E. coli*, as previously reported (33, 50, 60). However, other studies reported

higher *bla*_{CTX-M-2} frequencies in Enterobacteriaceae, with results ranging between 52.3% and 89.3% (54, 55, 62). For the *bla*_{KPC-like} we found a 6.4% frequency for Enterobacteriaceae, similar to that found by Jaskulski *et al.* (50) and Ribeiro *et al.* (63), and 33.3% for *K. pneumoniae* isolated from patients, in accordance with Rieger *et al.* (64), Tuon *et al.* (65) and Cabral *et al.* (66).

In *Acinetobacter* spp. we found an antimicrobial profile much more resistant in patients than in hospital settings and healthcare workers. MDR classification and resistance to carbapenems rates were very high in patients colonized or infected by *Acinetobacter* spp., with *Acinetobacter baumannii* complex having a central role in this observation.

The AST profile of *Acinetobacter* spp. isolated from patients were very similar to other studies reported in Brazil and Latin America, with some specific exceptions: Martins *et al.* (67) found resistance to amikacin in 78.1%, to polymyxin B in 39.0% and to gentamicin in 84.3% of MDR *A. baumannii* of Southeast Brazil, while in the present study we found no resistance to amikacin and colistin (polymyxin E) and a gentamicin resistance in 46.2% of the *Acinetobacter* spp. from patients; Gales *et al.* (46) found a higher resistance to amikacin (59.1%) and lower resistance to imipenem and meropenem (73.0% and 72.7%, respectively, compared to 92.3% for both in the present study), while Jones *et al.* (44) also found higher resistance to amikacin (67.6%) and lower resistance to imipenem and meropenem (75.7% for both) in *A. baumannii* isolates.

The *bla*_{OXA-23-like} detection in *A. baumannii* complex isolated from patients followed the rate of carbapenem resistance, actually they were the same (92.3%), which shows the importance of this carbapenemase gene for this species. The carbapenem resistance in Brazilian studies with *Acinetobacter* spp. isolated from patients ranged between 30.0% and 91.2% (42, 43, 46, 47, 49), while *bla*_{OXA-23-like} frequencies are reported from 41.7% to 100% (43, 46, 47, 57, 67-82) and in the present study, 42.3% of *Acinetobacter* spp. tested positive for *bla*_{OXA-23-like} in patients, environment and healthcare workers together. The absence of *bla*_{OXA-51-like} in some *A. baumannii* complex isolates, that includes *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* and *A. nosocomialis* species (83), allowed us to show the correct species identification of 22 non-*baumannii* isolates by V3/V4 16S rRNA sequencing. A study conducted by Vasconcelos *et al.* (71) reported the absence of *bla*_{OXA-51-like} in non-*baumannii* isolates, while Teixeira *et al.* (84) reported a frequency of 41.7% for non-*baumannii*. We did not find the *bla*_{OXA-143-like} gene and

the studies in Brazil report absence (43, 71, 72), low (47, 68) and high frequencies for this carbapenemase gene (78, 85). Some other studies show null or low prevalences of *bla*_{OXA-58-like} (43, 74, 78, 86) and *bla*_{OXA-72-like} (67, 69, 71, 78, 87), with the positive results restricted to Southeast Brazilian hospitals in most of the cases, while they were not identified in the present study.

The AST profile for *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients identified here were similar to previous reported by Jones *et al.* (44), while Gales *et al.* (46) found a higher resistance rate for all the tested antibiotics. However, in both studies we can see higher carbapenems resistance rates, ranged from 38.4% and 46.7%, than we identified in the present study (resistance to meropenem found in 21.1% and to imipenem in 26.3% of *P. aeruginosa* from patients).

In *P. aeruginosa*, we highlight the presence of *bla*_{SPM-like} gene (15.8% for isolates from patients) helping to define the phenotypic MDR profile. Previous studies with *P. aeruginosa* reported *bla*_{SPM-like} frequencies between 4.5% and 5.9% (30, 45, 48), while studies with *P. aeruginosa* with a MDR or carbapenem resistant profile reported higher and more variable frequencies, ranged from 17.8% to 64.1% (48, 57, 92-96).

Despite the description of several cases of *bla*_{NDM-like} in Brazil in different GNB species (43, 98-101) the present study did not identify this carbapenemase gene, which can be explained by its low incidence in the country, 0.97% in Enterobacteriaceae according to Rozales *et al.* (102). The *bla*_{IMP-like} and *bla*_{VIM-like} metallo-beta-lactamases (MBL) genes and *bla*_{GES-like} carbapenemase gene were not found in the present surveillance program, however others Brazilian studies found low frequencies of these genes in *P. aeruginosa* and *A. baumannii* (45, 48, 57, 70, 85, 92, 94, 103, 104).

It is important to point out that all studies cited were carried out with GNB isolated from patients and the identification of the resistance genes were restricted in most of the cases to resistant GNB (ESBL, MBL or carbapenem resistant, for example), becoming an important bias for the comparative analysis.

We observed a notable difference in the contamination pattern between Enterobacteriaceae compared to *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. Enterobacteriaceae showed similar spread among patients, hospital environment and healthcare workers, a pattern not seem for the other two GNB genus. It is well known that *Acinetobacter* spp. is responsible for biofilm formation in abiotic surfaces, becoming a concern problem in healthcare settings (88). However, maybe biofilm formation by

Acinetobacter spp. more susceptible to antimicrobials could protect the surfaces of MDR *Acinetobacter* spp. contamination, hence the difference observed between patients and environment resistance profiles, not seen in Enterobacteriaceae. We found something similar in *Pseudomonas* spp., another GNB species that classically forms biofilm (89): MDR profile was identified only in patients and the *Pseudomonas* spp. isolated from environment samples were all not MDR. A recent study conducted by Hu *et al.* (90) showed that sporadic *A. baumannii* isolates had greater ability to form biofilm than the outbreak and epidemic *A. baumannii* isolates. Another study conducted by Perez (91) in Brazil showed that *A. baumannii* resistant to meropenem had a reduced ability to produce biofilm compared to *A. baumannii* susceptible to meropenem. Kaiser *et al.* (89) found that extensively drug resistant (XDR) *P. aeruginosa* had elevated ability to form biofilm than nonXDR isolates, however the endemic strains showed controversial results, with the highest biofilm formation ability of all groups. These findings support the hypothesis that resistant *A. baumannii* or *P. aeruginosa* identified in patients are less likely to colonize abiotic surfaces, once they could have less potential to form biofilms.

Two interesting cases of patients showing contamination by GNB in the three isolation sites (hands, nasal and rectal swabs) were a case involving *P. aeruginosa* that occurred with an ICU patient and a case identified in a IMW patient, colonized by *K. pneumoniae*. In both cases the GNB was present in the three isolation sites and with the same MDR, carbapenem and extended-spectrum cephalosporins resistant profile. These findings help to demonstrate the importance of hygiene practices and patients surveillance, with special attention to the barrier-breaking events, since the contamination of isolation sites like the hands, facilitates the contamination of bed equipments and healthcare workers with MDR GNB, as well as could difficult the patient treatment, once a recolonization event can occur.

For our knowledge, this is the first extensive study for the screening and antimicrobial resistance profile characterization of the HAI-related GNB in a hospital that sought the correlation among patients, environment and healthcare workers. This study helped to understand more about resistant HAI-related GNB circulating in a hospital and reveals that spread of HAI-related GNB within the hospital environment is higher than predicted, indicating that healthcare workers, hospital areas and equipment are key factors on MDR gram-negative bacteria dissemination. An active surveillance program can be a powerful tool

for the understanding and control of HAI, however, it is important to point out that the biggest challenge to be faced with the implementation of an active surveillance program is that it requires a formal leadership and a committed team to use well all their potential results.

References

1. **World Health Organization (WHO)**. 2011. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Geneva.
2. **Hawkey PM**. 2015. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A product of globalization. *J Hosp Infect* **89**:241–247.
3. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA.
4. **Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O**. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* **13**:1057–1098.
5. **World Health Organization (WHO)**. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva.
6. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)**. 2013. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm.
7. **Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, Keohane C, Denham CR, Bates DW**. 2013. Health Care–Associated Infections: A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System. *JAMA Intern Med* **173**:2039.
8. **Munoz-Price LS, Arheart KL, Mills JP, Cleary T, Depascale D, Jimenez A, Fajardo-Aquino Y, Coro G, Birnbach DJ, Lubarsky DA**. 2012. Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am J Infect Control* **40**:e245–e248.
9. **Otter JA, Yezli S, Salkeld JAG, French GL**. 2013. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* **41**:S6–S11.
10. **Hota B**. 2004. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* **39**:1182–1189.
11. **Gaudart J, Cloutman-Green E, Guillas S, D'Arcy N, Hartley JC, Gant V, Klein N**. 2013. Healthcare Environments and Spatial Variability of Healthcare Associated Infection Risk: Cross-Sectional Surveys. *PLoS One* **8**:1–8.

12. **Hawkey PM, Jones AM.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* **64**.
13. **Levy SB, Marshall B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *NatMed* **10**:S122–S129.
14. **Davies J, Davies D.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:417–433.
15. **Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WWL, Hoang LM.** 2017. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control* **45**:170–179.
16. **Fournier P-E, Drancourt M, Colson P, Rolain J-M, Scola B La, Raoult D.** 2013. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol* **11**:574–585.
17. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet D. L.** 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology* **18**:268–281.
18. **Pittet D, Allegranzi B, Storr J, Nejad SB, Dziekan G, Leotsakos A, Donaldson L.** 2008. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J Hosp Infect* **68**:285–292.
19. **Raza MW, Kazi BM, Mustafa M, Gould FK.** 2004. Developing countries have their own characteristic problems with infection control. *J Hosp Infect* **57**:294–299.
20. **Peleg AY, Hooper, David C.** 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* **362**:1804–1813.
21. **Rossi F.** 2011. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis* **52**:1138–1143.
22. **Weber DJ, Anderson D, Rutala WA.** 2013. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis* **26**:338–44.
23. **Otter JA, Yezli S, French GL.** 2011. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* **32**:687–699.
24. **Huslage K, Rutala WA, Sickbert-Bennett E, Weber DJ.** 2010. A Quantitative Approach to Defining “High-touch” Surface in Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**:850–853.
25. **Graves N, Weinholt D, Tong E, Birrell F, Doidge S, Ramritu P, Halton K, Lairson D, Whitby M.** 2007. Effect of healthcare-acquired infection on length of hospital stay and cost. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**:280–92.
26. **Sheng WH, Wang JT, Lu DCT, Chie WC, Chen YC, Chang SC.** 2005. Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect* **59**:205–214.

27. **Rubio FG, Oliveira VDC, Rangel RMC, Nogueira MCL, Almeida MTG.** 2013. Trends in bacterial resistance in a tertiary university hospital over one decade. *Brazilian J Infect Dis* **17**:480–482.
28. **Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, Mendes C.** 2005. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* **9**:216–24.
29. **Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C.** 2005. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz J Infect Dis* **9**:44–51.
30. **Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN.** 2005. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* **25**:57–61.
31. **Boszczowski I, De Almeida Júnior JN, De Miranda JP, Freire MP, Guimarães T, Chaves CE, Cais DP, Strabelli TMV, Risek CF, Soares RE, Rossi F, Costa SF, Levin AS.** 2012. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* bacteraemia associated with contaminated anticoagulant citrate dextrose solution: New name, old bug? *J Hosp Infect* **80**:255–258.
32. **Pillonetto M, Arend LN, Faoro H, Espindula HRSD, Blom J, Smits THM, et al.** 2018 Emended description of the genus *Phytobacter*, its type species *Phytobacter diazotrophicus* (Zhang 2008) and description of *Phytobacter ursingii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**(1):176-184.
33. **Tavares CP, Pereira PS, Marques EA, Faria C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves C de FM, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA.** 2015. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **82**:326–330.
34. **Shimose LA, Masuda E, Sfeir M, Caban AB, Bueno MX, dePascale D, Spychala CN, Cleary T, Namias N, Kett DH, Doi Y, Munoz-price LS.** 2016. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Concomitant Contamination of Air and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* **37**:777-81.
35. **Munoz-Price LS, Namias N, Cleary T, Fajardo-Aquino Y, Depascale D, Arheart KL, Rivera JI, Doi Y.** 2013. *Acinetobacter baumannii*: Association between Environmental Contamination of Patient Rooms and Occupant Status. *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**:517–520.
36. **Levin AS, Gobara S, Mendes CMF, Cursino MR, Url S.** 2013. Environmental Contamination by Multidrug - Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**:717-20.
37. **Oliveira AC, Damasceno QS, Piscoya M, Nicoli JR.** 2012. Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. *Am J Infect Control* **40**:186–187.

38. **Lozupone C, Stombaugh J, Gonzalez A, Ackermann G, Wendel D, Vasquez-Baeza Y.** 2013. Meta-analysis studies of the human microbiota. *Genome Res* **23**:1704–1714.
39. **Bessesen MT, Kotter CV, Wagner BD, Adams JC, Kingery S, Benoit JB, Robertson CE, Janoff EN, Frank DN.** MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. 2015. *J Infect* **71**:649–657.
40. **Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, Wos-Oxley M, Becker K.** 2016. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ Microbiol* **18**:2130–2142.
41. **Arnoni M V, Berezin EN, Martino MD.** 2007. Risk factors for nosocomial bloodstream infection caused by multidrug resistant gram-negative bacilli in pediatrics. *Brazilian J Infect Dis* **11**:267–271.
42. **Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR.** 2012. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: An urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect* **80**:351–353.
43. **Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP.** 2015. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol* **36**:860–862.
44. **Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, Vega S, Zurita J, Cepparulo M, Castanheira M.** 2013. Susceptibility rates in Latin American nations: Report from a regional resistance surveillance program (2011). *Brazilian J Infect Dis* **17**:672–681.
45. **Fehlberg LCC, Xavier DE, Peraro PP, Marra AR, Edmond MB, Gales AC.** 2012. Strains Causing Bloodstream Infections: Comparative Results Between Brazilian and American Isolates. *Microb Drug Resist* **18**:402–407.
46. **Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS.** 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**:354–360.
47. **Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC.** 2011. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* **66**:452–454.
48. **Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F.** 2010. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (São Paulo)* **65**:825–829.
49. **Furtado GH, Martins ST, Machado AM, Wey SB, Medeiros EA.** 2006. Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in Sao Paulo, Brazil: a 7-year study. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**:1270–1273.

50. **Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges J V., Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC.** 2013. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* **42**:76–79.
51. **Nogueira K, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda De Messias Reason I, Da Silva MJ, Dalla-Costa LM.** 2014. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **32**:87–92.
52. **Wollheim C, Guerra IMF, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare APL, Barth AL, Echeverrigaray S, da Costa SOP.** 2011. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* **15**:138-43.
53. **Minarini LAR, Poirel L, Trevisani NAC, Darini ALC, Nordmann P.** 2009. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**:202–206.
54. **Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM.** 2015. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* **48**:162–169.
55. **Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Mamizuka EM, Remeli GA, Almeida MTG De, Ru FG, Nogueira MCL.** 2011. High Prevalence of blaCTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of blaSHV-12. *Microb Drug Resist* **17**:7–16.
56. **Minarini LAR, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC V, Martinez R, Darini ALC.** 2008. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. *Curr Microbiol* **56**:587–591.
57. **Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CAP, Carneiro I, Reis M, De Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB, Brazilian SCOPE Study Group.** 2011. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* **49**:1866–1871.
58. **Vasques MRG, Bello AR, Lamas CDC, Correa J, Pereira JAA.** 2011. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* **15**:28–33.
59. **Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD.** 2009. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella*

- pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother **63**:265–268.
60. **Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JDD.** 2011. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. Clin Microbiol Infect **17**:1039–1043.
 61. **Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceição M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho MES, Assef APDAC, Asensi MD.** 2013. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. Brazilian J Infect Dis **17**:640–646.
 62. **Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Matté GR, Matté MH.** 2015. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. J Infect Dev Ctries **9**:890–897.
 63. **Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL da C, Zavascki AP, Barth AL.** 2013. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. J Med Microbiol **62**:1721–1727.
 64. **Rieger A, Mohr G, Vargas da Silva L, Fernando de Oliveira C, Pereira da Rocha M.** 2016. Update on monitoring the spread of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. in South Brazil. J Hosp Infect **92**:107–111.
 65. **Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, Pentead-Filho SR, Pilonetto M, Zavascki AP.** 2012. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Brazilian J Infect Dis **16**:416–419.
 66. **Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS.** 2012. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop **45**:572–578.
 67. **Martins HSI, Bomfim MRQ, França RO, Farias LM, Carvalho MAR, Serufo JC, Santos SG.** 2014. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. Int J Environ Res Public Health **11**:1465–1478.
 68. **Neves FC, Clemente WT, Lincopan N, Paião ID, Neves PR, Romanelli RM, Lima SSS, Paiva LF, Mourão PHO, Nobre-Junior VA.** 2016. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. Brazilian J Infect Dis. doi: 10.1016/j.bjid.2016.08.004.
 69. **Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, De Vasconcellos FM, Dos Santos LF, Romero EC, De Oliveira Garcia D.** 2016. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15 and 79. Antimicrob Agents Chemother **60**:2545–2547.
 70. **Leite GC, Oliveira MS, Perdigo-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, Levin AS, Costa SF.** 2016. Antimicrobial Combinations against

Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. PLoS One 11:e0151270.

71. **Vasconcelos ATR, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiliense DM, Rossi F, Furtado GHC, Carneiro ICRS, da Silva JO, Ribeiro J, Lima KVB, Correa L, Britto MH, Silva MT, da Conceição ML, Moreira M, Martino MD V, de Freitas MR, Oliveira MS, Dalben MF, Guzman RD, Cayô R, Morais R, Santos SA, Martins WMBS.** 2015. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis* **83**:382–385.
72. **Pagano M, Martins AF, Machado ABMP, Barin J, Barth AL.** 2013. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect* **41**:330–333.
73. **Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, Higgins PG, Seifert H, Pilonetto M.** 2013. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* **77**:337–340.
74. **Clímaco EC, Oliveira ML de, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, Da Costa Darini AL.** 2013. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infect Genet Evol* **19**:127–133.
75. **Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VBDC, Coelho-Souza T, Maranhães ACDG, Cacci LC, de Figueiredo MP, Dias RCS, Costa-Lourenço APR, Ferreira ALP, Dalla-Costa L, Nouér SA, Santoro-Lopes G, Riley LW, Moreira BM.** 2013. Imported and Intensive Care Unit-Born *Acinetobacter baumannii* Clonal Complexes: One-Year Prospective Cohort Study in Intensive Care Patients. *Microb Drug Resist* **19**:216–23.
76. **Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL.** 2012. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* **40**:108–112.
77. **Corrêa LL, Botelho LAB, Barbosa LC, Mattos CS, Carballido JM, de Castro CLT, Mondino PJJ, de Paula GR, de Mondino SSB, de Mendonça-Souza CRV.** 2012. Detection of bla(OXA-23) in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. *Braz J Infect Dis* **16**:521–6.
78. **Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, De Araújo MRE, Lincopan N.** 2011. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1322–1323.

79. **Furtado GH, Cavalcante AC, Medeiros EA, Gales AC, Oliveira VG, Girardelo R.** 2011. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: Epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control* **39**:706–708.
80. **Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, do Nascimento AJ, Carignano E, Dalla Costa LM.** 2010. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control* **38**:308–314.
81. **Carvalho KR, Carvalho-Assef APDA, Peirano G, Santos LCG dos, Pereira MJF, Asensi MD.** 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* **34**:25–28.
82. **Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado ABMP, Barth AL.** 2009. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infection* **37**:474–476.
83. **Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vanechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L.** 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* **162**:393–404.
84. **Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pitt CP, Barth AL.** 2013. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAbal-blaOXA-23 genes in Latin America. *J Clin Microbiol* **51**:2739–2741.
85. **Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF.** 2012. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* **39**:396–401.
86. **Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonca-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS.** 2011. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**:368–370.
87. **Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD.** 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* **79**:468–472.
88. **Longo F, Vuotto C, Donelli G.** 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* **37**:119–27.
89. **Kaiser SJ, Muters NT, DeRosa A, Ewers C, Frank U, Günther F.** 2016. Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals:

- interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* doi: 10.1007/s10096-016-2792-8.
90. **Hu, Lihua H, Xiaoxia T, Fanliang M, Jianzhong Z.** 2016. Biofilm may not be Necessary for the Epidemic Spread of *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* **6**:32066.
 91. **Perez LRR.** 2015. *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J Chemother* **27**:13-6.
 92. **Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF.** 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **13**:43.
 93. **Lucena A, Dalla Costa LM, Nogueira KS, Matos AP, Gales AC, Paganini MC, Castro MES, Raboni SM.** 2014. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *J Hosp Infect* **87**:234–240.
 94. **Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, Nogueira MC.** 2012. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis* **12**:176.
 95. **Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL.** 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* **35**:457–460.
 96. **Carvalho APD, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA de P, Teixeira LM, Marques E de A.** 2006. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* **12**:103–8.
 97. **Carvalho-Assef APD alincourt, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, Da Silva RCF, Falci DR, Asensi MD.** 2013. Isolation of NDM-producing providencia rettgeri in brazil. *J Antimicrob Chemother* **68**:2956–2957.
 98. **Carvalho-Assef APDA, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TPG, Marques EA, Timm LN, Da Silva RCF, Falci DR, Asensi MD.** 2014. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:2475–2476.
 99. **Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD.** 2014. First report of NDM-1-

- producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:7592–7594.
100. **Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD.** 2015. Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**:580–2.
 101. **Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJU, Chebabo A, Pereira RMG, Gales AC, Pignatari ACC.** 2015. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian J Med Biol Res* **48**:174–177.
 102. **Rozales P, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Barth AL, Zavascki AP, Lutz L, Falci DR.** 2014. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil *Int J of Infect Dis* **25**:79–81.
 103. **Araujo BF, Ferreira ML, De Campos PA, Royer S, Batistão DWDF, Dantas RCC, Gonçalves IR, Faria ALS, De Brito CS, Yokosawa J, Gontijo-Filho PP, Ribas RM.** 2016. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *P. aeruginosa* carrying aac(6')-ib-cr, qnrS1 and blaSPM genes in Brazil. *PLoS One* **11**:1–15.
 104. **Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T.** 2011. Detection of SPM and IMP metallo-beta-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Brazilian J Infect Dis* **15**:478–481.

Table S1. List of the sampling points in the Emergency (EMG), Internal Medicine Ward (IMW), Surgical Inpatient Unit (SUW), General Surgery Unit (GSU) and Intensive Care Unit A and B (ICU-A and ICU-B) of Professor Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital, Florianópolis, SC, Brazil.

Sample N°	Unit	Sample	Description
1	EMG	HCW-1	Hands
2	EMG	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
3	EMG	HCW-1	Cell Phone
4	EMG	HCW-2	Hands
5	EMG	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
6	EMG	HCW-2	Cell Phone
7	EMG	PT-1	Rectum
8	EMG	PT-1	Hands
9	EMG	PT-1	Nasal
10	EMG	PT-2	Rectum
11	EMG	PT-2	Hands
12	EMG	PT-2	Nasal
13	EMG	PT-3	Rectum
14	EMG	PT-3	Hands
15	EMG	PT-3	Nasal
16	EMG	Bed 1	Bed Rail
17	EMG	Bed 1	Medical Gas Regulator and IV Stand
18	EMG	Bed 2	Bed Rail
19	EMG	Bed 2	Medical Gas Regulator and IV Stand
20	EMG	Bed 3	Bed Rail
21	EMG	Bed 3	Medical Gas Regulator and IV Stand
22	EMG	HCW's Bathroom	Soap Dispenser, Tap and Flush Button
23	EMG	Nurse Station	Workstation, Computer Keyboard and Telephone
24	EMG	Medication Room	Soap Dispenser and Tap
25	EMG	Medication Room	High Touch Surfaces
26	EMG	Infusion Room	Patient Chair
27	EMG	Infusion Room	IV Stand
28	EMG	Prescription	Computers
29	EMG	Medical Procedures Room	Scrub Sink
30	EMG	Medical Procedures	Bed

		Room	
31	EMG	Bandage Room	High Touch Surfaces
32	EMG	Doctor's office	Bed
33	EMG	Doctor's office	Computer Desk
34	EMG	Doctor's office	Soap Dispenser and Tap
35	EMG	Reception	Reception Chairs
36	EMG	Lunch Room	High Touch Surfaces
37	EMG	Nursing Sleep Room	High Touch Surfaces
38	EMG	Medical Equipment in Common Use	Alcohol Gel Dispenser
39	EMG	Medical Equipment in Common Use	Medication Cart
40	IMW	HCW-1	Hands
41	IMW	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
42	IMW	HCW-1	Cell Phone
43	IMW	HCW-2	Hands
44	IMW	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
45	IMW	HCW-2	Cell Phone
46	IMW	PT-1	Rectum
47	IMW	PT-1	Hands
48	IMW	PT-1	Nasal
49	IMW	PT-2	Rectum
50	IMW	PT-2	Hands
51	IMW	PT-2	Nasal
52	IMW	Bed 1	Soap Dispenser, Tap and Flush Button of the Bathroom
53	IMW	Bed 1	Bed Rail
54	IMW	Bed 1	Medical Gas Regulator and IV Stand
55	IMW	Bed 2	Soap Dispenser, Tap and Flush Button of the Bathroom
56	IMW	Bed 2	Bed Rail
57	IMW	Bed 2	Medical Gas Regulator and IV Stand
58	IMW	Nurse Station	Workstation, Computer Keyboard and Telephone
59	IMW	Medication Room	Soap Dispenser and Tap
60	IMW	Medication Room	High Touch Surfaces
61	IMW	Locker Room	Lockers
62	IMW	Locker Room	Soap Dispenser, Tap and

			Flush Button of the Bathroom
63	IMW	Lunch Room	High Touch Surfaces
64	IMW	Nursing Sleep Room	High Touch Surfaces
65	IMW	Medical Equipment in Common Use	Alcohol Gel Dispenser
66	IMW	Medical Equipment in Common Use	Portable Glucose Analyzer
67	SUW	HCW-1	Hands
68	SUW	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
69	SUW	HCW-1	Cell Phone
70	SUW	HCW-2	Hands
71	SUW	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
72	SUW	HCW-2	Cell Phone
73	SUW	PT-1	Rectum
74	SUW	PT-1	Hands
75	SUW	PT-1	Nasal
76	SUW	PT-2	Rectum
77	SUW	PT-2	Hands
78	SUW	PT-2	Nasal
79	SUW	Bed 1	Soap Dispenser, Tap and Flush Button of the Bathroom
80	SUW	Bed 1	Medical Gas Regulator and IV Stand
81	SUW	Bed 1	Bed Rail
82	SUW	Bed 2	Soap Dispenser, Tap and Flush Button of the Bathroom
83	SUW	Bed 2	Bed Rail
84	SUW	Bed 2	Medical Gas Regulator and IV Stand
85	SUW	Nurse Station	Workstation, Computer Keyboard and Telephone
86	SUW	Medication Room	Soap Dispenser and Tap
87	SUW	Medication Room	High Touch Surfaces
88	SUW	Bandage Room	High Touch Surfaces
89	SUW	Lunch Room	High Touch Surfaces
90	SUW	Nursing Sleep Room	High Touch Surfaces
91	SUW	Medical Equipment in Common Use	Alcohol Gel Dispenser
92	SUW	Medical Equipment in	Portable Glucose Analyzer

Common Use			
93	GSU	HCW-1	Hands
94	GSU	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
95	GSU	HCW-1	Cell Phone
96	GSU	HCW-2	Hands
97	GSU	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
98	GSU	HCW-2	Cell Phone
99	GSU	Post-anesthesia Care	Bed Rail
100	GSU	Post-anesthesia Care	Medical Equipment
101	GSU	Post-anesthesia Care	High Touch Surfaces
102	GSU	Operating Room in Use	Surgical Table
103	GSU	Operating Room in Use	Anesthesia Cart - High Touch Surfaces
104	GSU	Operating Room in Use	Laryngoscope Tray
105	GSU	Operating Room in Use	Injectable Anesthetics Tray
106	GSU	Clean Operating Room	Surgical Table
107	GSU	Clean Operating Room	Surgical Light
108	GSU	Clean Operating Room	Infusion Pump
109	GSU	Clean Operating Room	Electrosurgical Generator
110	GSU	Locker Room	Lockers
111	GSU	Locker Room	Soap Dispenser and Tap
112	GSU	Nursing Sleep Room	High Touch Surfaces
113	GSU	Lunch Room	High Touch Surfaces
114	GSU	Medical Equipment in Common Use	Nurse Computer
115	GSU	Medical Equipment in Common Use	Stretcher
116	GSU	Medical Equipment in Common Use	Alcohol Gel Dispenser
117	ICU-A	HCW-1	Hands
118	ICU-A	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
119	ICU-A	HCW-1	Cell Phone
120	ICU-A	HCW-2	Hands
121	ICU-A	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
122	ICU-A	HCW-2	Cell Phone
123	ICU-A	PT-1	Rectum
124	ICU-A	PT-1	Hands
125	ICU-A	PT-1	Nasal
126	ICU-A	PT-2	Rectum
127	ICU-A	PT-2	Hands

128	ICU-A	PT-2	Nasal
129	ICU-A	Bed 1	Bed Rail
130	ICU-A	Bed 1	Infusion Pump
131	ICU-A	Bed 1	Heart Monitor
132	ICU-A	Bed 1	Curtain
133	ICU-A	Bed 2	Bed Rail
134	ICU-A	Bed 2	Utility Cart
135	ICU-A	Bed 2	Supporting Wall of Personal Protective Clothing
136	ICU-A	Bed 2	Thermometer
137	ICU-A	Nurse Station	Workstation, Computer Keyboard and Telephone
138	ICU-A	Nurse Station	Medical Records Clipboard
139	ICU-A	Prescription	Computer Keyboard
140	ICU-A	Medical Equipment Room	Clean Medical Equipment
141	ICU-A	Locker Room	Lockers
142	ICU-A	Locker Room	Soap Dispenser, Tap and Flush Button of the Bathroom
143	ICU-A	Utility Room	High Touch Surfaces
144	ICU-A	Utility Room	Dryer
145	ICU-A	Medical Sleep Room	High Touch Surfaces
146	ICU-A	Nursing Sleep Room	High Touch Surfaces
147	ICU-A	Lunch Room	High Touch Surfaces
148	ICU-B	HCW-1	Hands
149	ICU-B	HCW-1	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
150	ICU-B	HCW-1	Cell Phone
151	ICU-B	HCW-2	Hands
152	ICU-B	HCW-2	Protective Clothing (White Coat or Scrub)
153	ICU-B	HCW-2	Cell Phone
154	ICU-B	PT-1	Rectum
155	ICU-B	PT-1	Hands
156	ICU-B	PT-1	Nasal
157	ICU-B	PT-2	Rectum
158	ICU-B	PT-2	Hands
159	ICU-B	PT-2	Nasal
160	ICU-B	Bed 1	Bed Rail
161	ICU-B	Bed 1	Infusion Pump
162	ICU-B	Bed 1	Heart Monitor
163	ICU-B	Bed 1	Curtain
164	ICU-B	Bed 2	Bed Rail

165	ICU-B	Bed 2	Utility Cart
166	ICU-B	Bed 2	Supporting Wall of Personal Protective Clothing
167	ICU-B	Bed 2	Thermometer
168	ICU-B	Nurse Station	Workstation, Computer Keyboard and Telephone
169	ICU-B	Nurse Station	Refrigerator
170	ICU-B	Prescription	Computer Keyboard
171	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Alcohol Gel Dispenser
172	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Clean Clothes Cart
173	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Portable Glucose Analyzer
174	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Cuff Pressure Gauge
175	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Portable Shower Bath
176	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Crash Cart
177	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Portable Image Intensifier (X-Ray)
178	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Ultrasound Machine
179	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Patient Transfer Board
180	ICU-B	Medical Equipment in Common Use	Physiotherapy Chair

HCW: Healthcare Worker.

PT: Patient.

Table S2. Panel of antimicrobial resistance-related genes tested by quantitative PCR (qPCR) on Gram-negative bacteria (GNB) isolates related to healthcare associated infection (HAI) obtained in this study.

	Kl	En	Ps	Ac	Ot
<i>bla</i> _{OXA-23} -like					
<i>bla</i> _{OXA-48} -like					
<i>bla</i> _{OXA-51} -like					
<i>bla</i> _{OXA-58} -like					
<i>bla</i> _{OXA-72} -like					
<i>bla</i> _{OXA-143} -like					
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group					
<i>bla</i> _{CTX-M-2} group					
<i>bla</i> _{CTX-M-8} group					
<i>bla</i> _{CTX-M-9} group					
<i>bla</i> _{CTX-M-25} group					
<i>bla</i> _{KPC} -like					
<i>bla</i> _{SHV} -like					
<i>bla</i> _{NDM} -like					
<i>bla</i> _{IMP} -like					
<i>bla</i> _{VIM} -like					
<i>bla</i> _{GES} -like					
<i>bla</i> _{SPM} -like					

Kl: *Klebsiella* spp. En: Other Enterobacteriaceae. Ps: *Pseudomonas* spp. Ac: *Acinetobacter* spp. Ot: Other

Figure S1. Abundance of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW) (Phenotypic identification).

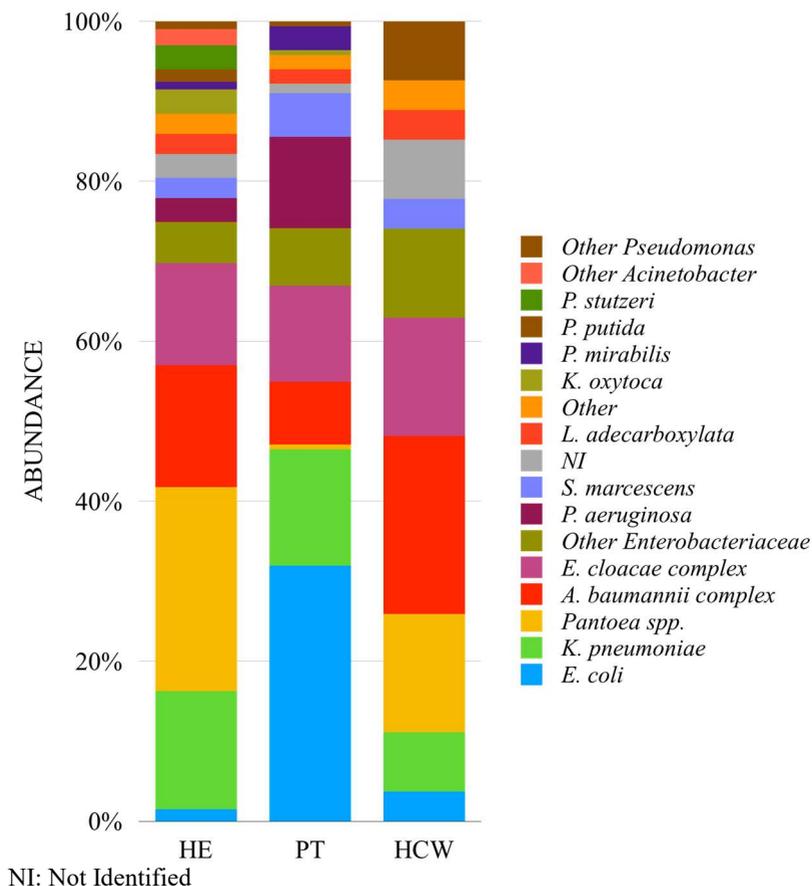


Table S3. Distribution of gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) and their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile, according to the hospital units.

Unit	Samples	GNB +	GNB + (%)	Isolates	Isolates with AST	MDR	MDR (%)	CARB R	CARB R (%)	ESC R	ESC R (%)
EMG	234	77	32.9	97	73	16	21.9	5	6.8	23	31.5
IMW	162	39	24.1	64	58	17	29.3	12	20.7	26	44.8
SUW	156	47	30.1	65	52	19	36.5	4	7.7	14	26.9
GSU	144	17 ^a	11.8	28	16	0	0	0	0	3	18.8
ICU-A	186	44	23.7	67	46	17	30.9	9	16.4	20	36.4
ICU-B	198	51	25.8	69	56	32 ^b	57.1	25 ^c	44.6	34 ^d	60.7
Total	1,080	275	-	390	310	101	-	55	-	120	-
P		0.0003				0.0001		<0.0001		0.0014	

^a GSU was statistically significant different from all the other units ($p < 0.01$).

^b ICU-B was statistically significant different from all the other units ($p < 0.01$).

^c ICU-B was statistically significant different from all the other units ($p < 0.05$).

^d ICU-B was statistically significant different from all the other units ($p < 0.05$), except from IMW.

AST: Antimicrobial susceptibility test

EMG: Emergency; IMW: Internal Medicine Ward; SUW: Surgical Ward; GSU: General Surgery Unit; ICU-A Intensive Care Unit A; ICU-B: Intensive Care Unit B.

Table S4. Distribution of gram-negative bacteria (GNB) species related to healthcare associated infection (HAI) isolated from distinct hospital areas, patients (PT) and healthcare workers (HCW) according to their sampling sites and to their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile.

Sampling site/area	N	%	GNB	MDR % ^a	ESC R %	CARB R %
PT rectal swab	116	37.4	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i> complex, <i>A. baumannii</i> complex	36.2	27.6	18.1
HCW rest areas	61	19.7	<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> complex, <i>E. cloacae</i> complex, <i>K. oxytoca</i>	13.1	32.8	0.0
PT bed equipment	26	8.4	<i>A. baumannii</i> complex, <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> complex, <i>P. aeruginosa</i>	34.6	57.7	19.2
PT nasal swab	29	9.4	<i>A. baumannii</i> complex, <i>S. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i> complex, <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	48.3	44.8	37.9
HCW working areas	13	4.2	<i>A. baumannii</i> complex, <i>P. stutzeri</i>	7.7	38.5	15.4
Medical equipment in common use	13	4.2	<i>A. baumannii</i> complex, <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> complex	46.2	61.5	38.5
PT bed bathroom	18	5.8	<i>E. cloacae</i> complex, <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. oxytoca</i>	44.4	38.9	11.1
PT hands swab	12	3.9	<i>E. cloacae</i> complex, <i>A. baumannii</i> complex, <i>K. pneumoniae</i>	83.3	83.3	50.0
HCW protective clothing ^b	8	2.6	<i>A. baumannii</i> complex, <i>E. cloacae</i> complex, <i>K. pneumoniae</i>	12.5	62.5	12.5
HCW hands swab	9	2.9	<i>E. cloacae</i> complex, <i>A. baumannii</i> complex, <i>K. pneumoniae</i>	22.2	55.6	22.2
Hands cleaning equipment	2	0.6	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. maltophilia</i>	0.0	0.0	0.0

HCW cell phone	2	0.6	<i>E. cloacae</i> complex, <i>P. putida</i>	0.0	0.0	0.0
Operating room equipment	1	0.3	<i>P. mirabilis</i>	0.0	0.0	0.0
Total	310	100.0				

^aMDR: Multidrug Resistant according to the Acquired Resistance Classification (17).

^bWhite coat or scrub

Table S5. Distribution of of Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp. and Pseudomonas spp. isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW) and their resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC R), to carbapenem (CARB R) and multidrug resistance (MDR) profile.

Enterobacteriaceae							
	Isolates	MDR	MDR %	CARBA R	CARBA R %	ESC R	ESC R %
PT	124	50	40.3	22	17.7	39	31.5
HE	85	25	29.4	8	9.4	25	29.4
HCW	11	2	18.2	2	18.2	4	36.4
Total	220	77	35.0	32	14.5	68	30.9
P		0.1311		0.2301		0.8783	
Acinetobacter spp.							
	Isolates	MDR	MDR %	CARBA R	CARBA R %	ESC R	ESC R %
PT	13	12	92.3	12	92.3	13	100.0
HE	33	5	15.2	6	18.2	30	90.9
HCW	6	1	16.7	1	16.7	6	100.0
Total	52	18	34.6	19	36.5	49	94.2
P		<0.0001		<0.0001		0.3999	
Pseudomonas spp.							
	Isolates	MDR	MDR %	CARBA R	CARBA R %	ESC R	ESC R %
PT	19	4	21.1	4	21.1	3	15.8
HE	14	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	33	4	21.1	4	21.1	3	15.8
P		-		-		-	

MDR: Multidrug Resistant according to the Acquired Resistance Classification (17).

Table S6. Frequencies of the beta-lactamases resistance genes identified in the total (TT) samples of each gram-negative bacteria (GNB) related to healthcare associated infection (HAI) group and for the most important GNB species isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Enterobacteriaceae^a				
R Gene % positive (C _q _{mean})	PT (n=124)	HE (n=85)	HCW (n=11)	Total (n=220)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	12.9 (20.8)	14.1 (23.4)	9.1 (20.7)	13.2 (21.9)
<i>bla</i> _{CTX-M-2} group	0.8 (15.8)	0.0 (-)	0.0 (-)	0.5 (15.8)
<i>bla</i> _{CTX-M-8} group	6.5 (23.6)	18.8 (22.9)	0.0 (-)	10.9 (23.1)
<i>bla</i> _{CTX-M-9} group	8.9 (22.7)	2.4 (23.5)	0.0 (-)	5.9 (22.8)
<i>bla</i> _{KPC-like}	7.3 (18.9)	4.7 (21.7)	0.0 (-)	5.9 (19.7)
<i>bla</i> _{SHV-like}	21.8 (21.6)	29.4 (22.6)	18.2 (21.6)	24.5 (22.1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>^b				
R Gene % positive (C _q _{mean})	PT (n=24)	HE (n=29)	HCW (n=2)	Total (n=55)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	37.5 (19.7)	13.8 (22.0)	0.0 (-)	23.6 (20.4)
<i>bla</i> _{CTX-M-8} group	16.7 (23.3)	24.1 (20.3)	0.0 (-)	20.0 (21.4)
<i>bla</i> _{CTX-M-9} group	25.0 (22.2)	3.4 (21.7)	0.0 (-)	12.7 (22.2)
<i>bla</i> _{KPC-like}	33.3 (19.3)	10.3 (18.6)	0.0 (-)	20.0 (19.1)
<i>bla</i> _{SHV-like}	91.7 (21.5)	72.4 (21.8)	100.0 (21.6)	81.8 (21.7)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex^c				
R Gene % positive (C _q _{mean})	PT (n=20)	HE (n=25)	HCW (n=4)	Total (n=49)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	25.0 (22.5)	16.0 (22.2)	25.0 (20.7)	20.4 (22.2)
<i>bla</i> _{CTX-M-8} group	0.0 (-)	12.0 (26.0)	0.0 (-)	6.1 (26.0)
<i>bla</i> _{CTX-M-9} group	25.0 (23.2)	4.0 (25.2)	0.0 (-)	12.2 (23.6)
<i>bla</i> _{KPC-like}	0.0 (-)	4.0 (30.9)	0.0 (-)	2.0 (30.9)
<i>bla</i> _{SHV-like}	10.0 (24.0)	8.0 (26.0)	0.0 (-)	8.2 (25.0)

<i>Escherichia coli</i> ^d				
R Gene % positive (Cq _{mean})	PT (n=53)	HE (n=3)	HCW (n=4)	Total (n=57)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	3.8 (21.9)	0.0 (-)	0.0 (-)	3.5 (21.9)
<i>bla</i> _{CTX-M-2} group	1.9 (15.8)	0.0 (-)	0.0 (-)	1.8 (15.8)
<i>bla</i> _{CTX-M-8} group	7.5 (23.8)	33.3 (31.4)	0.0 (-)	8.8 (25.3)
<i>bla</i> _{KPC-like}	1.9 (15.0)	0.0 (-)	0.0 (-)	1.8 (15.0)
<i>bla</i> _{SHV-like}	5.7 (20.5)	0.0 (-)	0.0 (-)	5.3 (20.5)
<i>Acinetobacter</i> spp. ^e				
R Gene % positive (Cq _{mean})	PT (n=13)	HE (n=33)	HCW (n=6)	Total (n=52)
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	92.3 (23.8)	36.4 (23.0)	33.3 (20.8)	50.0 (23.2)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	92.3 (19.4)	30.3 (19.3)	16.7 (19.1)	44.2 (19.3)
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex ^e				
R Gene % positive (Cq _{mean})	PT (n=13)	HE (n=30)	HCW (n=6)	Total (n=49)
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	92.3 (23.8)	40.0 (23.0)	33.3 (20.8)	53.1 (23.2)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	92.3 (19.4)	23.3 (19.0)	16.7 (19.1)	40.8 (19.2)
<i>Pseudomonas</i> spp. ^f				
R Gene % positive (Cq _{mean})	PT (n=19)	HE (n=14)	HCW (n=1)	Total (n=34)
<i>bla</i> _{SPM-like}	15.8 (24.2)	0.0 (-)	0.0 (-)	8.8 (24.2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^f				
R Gene % positive (Cq _{mean})	PT (n=19)	HE (n=6)	HCW (n=0)	Total (n=25)
<i>bla</i> _{SPM-like}	15.8 (24.2)	0.0 (-)	0.0 (-)	12.0 (24.2)

^a*bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{CTX-M-25} group, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

^b*bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-25} groups, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

^c*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CTX-M-25} groups, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

^d*bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CTX-M-25} groups, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

^e*bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-9} groups, *bla*_{GES-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like} and *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

^f*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CTX-M-25} groups, *bla*_{GES-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like} and *bla*_{VIM-like} were not detected in the tested samples.

* For comparison purposes, we considered only the GNB with AST to calculate the frequencies.

Table S7. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients (PT), hospital environment and equipment (HE) and healthcare workers (HCW).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=13)		HE (n=30)		HCW (n=6)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Penicillins + β -lactamase inhibitors	Ampicillin/Sulbactam	84.6	15.4	20.0	80.0	16.7	83.3
Aminoglycosides	Amikacin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	Gentamicin	46.2	53.8	10.0	90.0	16.7	83.3
	Cefepime	92.3	7.7	23.3	76.7	16.7	83.3
Extended-spectrum cephalosporins	Ceftazidime	92.3	7.7	23.3	76.7	33.3	66.7
	Ceftriaxone	100.0	0.0	90.0	10.0	100.0	0.0
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	92.3	7.7	20.0	80.0	16.7	83.3
Polymyxins	Colistin	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	92.3	7.7	20.0	80.0	16.7	83.3
	Meropenem	92.3	7.7	20.0	80.0	16.7	83.3
Penicillins *	Ampicillin	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Non-extended spectrum cephalosporins *	Cefuroxime	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
	Cefuroxime Axetil	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Cephameycins *	Cefoxitin	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Glycylcyclines *	Tigecycline	7.7	92.3	0.0	100.0	0.0	100.0

*Classes/antibiotics tested in AST-N239 card (Vitek[®]2, BioMérieux) but that were not used for the Acquired Resistance Classification.

Table S8. Phenotypic antimicrobial resistance profile based on Antimicrobial Susceptibility Test (AST) of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients (PT) and hospital environment and equipment (HE).

Antibiotic Class	Antibiotic Name	PT (n=19)		PT (n=6)	
		R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Aminoglycosides	Amikacin	26.3	73.7	0.0	100.0
	Gentamicin	26.3	73.7	0.0	100.0
Antipseudomonal cephalosporins	Cefepime	15.8	84.2	0.0	100.0
	Ceftazidime	15.8	84.2	0.0	100.0
Antipseudomonal Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	26.3	73.7	0.0	100.0
Polymyxins	Colistin	0.0	100.0	0.0	100.0
Antipseudomonal Carbapenems	Imipenem	26.3	73.7	0.0	100.0
	Meropenem	21.1	78.9	0.0	100.0
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Piperacillin/Tazobactam	15.8	84.2	0.0	100.0
Penicillins *	Ampicillin	100.0	0.0	100.0	0.0
Penicillins + β -lactamase inhibitors *	Ampicillin/Sulbactam	100.0	0.0	100.0	0.0
Cephameycins *	Cefoxitin	100.0	0.0	100.0	0.0
Non-extended spectrum cephalosporins *	Cefuroxime	100.0	0.0	100.0	0.0
	Cefuroxime Axetil	100.0	0.0	100.0	0.0
Extended-spectrum cephalosporins *	Ceftriaxone	100.0	0.0	100.0	0.0
Glycylcyclines *	Tigecycline	100.0	0.0	100.0	0.0

HCW *P. aeruginosa* with AST = 0.

*Classes/antibiotics tested in AST-N239 card (Vitek®2, BioMérieux) but that were not used for the Acquired Resistance Classification.

6.3 A determinação do microbioma hospitalar como ferramenta de manejo para o controle e a prevenção de IRAS

6.3.1 Caracterização dos grupos amostrais de pacientes, profissionais da saúde e do ambiente hospitalar segundo dados dos questionários

Os resultados apresentados na presente seção foram obtidos a partir das informações coletadas por meio de questionários (Anexo 2) aplicados aos pacientes e profissionais da saúde que assinaram o TCLE, além de consulta aos prontuários médicos dos pacientes e informações fornecidas pela CCIH do HU-UFSC, que foram analisados em conjunto com os resultados obtidos a partir das amostras biológicas coletadas.

Nas Figuras 11 e 12 estão disponíveis informações que caracterizam o grupo de pacientes do presente estudo.

Na Figura 11 na parte superior, da esquerda para direita estão disponíveis: o número total de pacientes, idade média dos pacientes e desvio padrão; proporção dos sexos dos pacientes; proporção dos pacientes que estiveram internados em mais de uma unidade do HU-UFSC na internação vigente; proporção dos pacientes que foram submetidos a pelo menos uma cirurgia na internação vigente; proporção dos pacientes que foram internados em pelo menos uma oportunidade nos 12 meses anteriores à internação vigente. Na parte inferior da Figura 11, da esquerda para a direita estão disponíveis: o tempo médio da internação vigente, segundo a unidade hospitalar; proporção dos pacientes em uso de dispositivo invasivo na internação vigente; proporção dos tipos de dispositivos invasivos utilizados pelos pacientes na internação vigente. Nessa figura é possível observar alguns fatores de risco para aquisição de IRAS, como:

- Internação em diversas unidades hospitalares: 54,5% (36/66) dos pacientes estiveram em pelo menos uma unidade diferente daquela na qual estavam no momento da coleta de seus dados e amostras biológicas. Sabe-se que a internação em unidades como a UTI, por exemplo, expõe o paciente a um maior risco de adquirir uma IRAS.
- A realização de cirurgia durante a internação, que ocorreu em 31,8% (21/66) dos pacientes do presente estudo.
- Internações recorrentes: 53,0% (35/66) dos pacientes tiveram pelo menos uma internação anterior.

- Internação por tempo prolongado: a média do tempo de internação variou de 6,8 dias para a EMG a 24,3 dias para a CRI. É importante salientar que um dos critérios de inclusão para participação dos pacientes no presente estudo foi o maior tempo de internação na unidade. Assim, esses dados refletem o tempo médio de internação de pacientes de longa estadia em cada uma das unidades do HU-UFSC. No entanto, ainda assim, as médias de internação foram muito longas para algumas unidades, como a CRI, que tem a característica de receber pacientes pré e pós-cirúrgicos. Na EMG, por exemplo, que em teoria é uma unidade apenas para atendimentos de urgência e emergência, com necessidade de encaminhamento para outras unidades caso o paciente necessite de internação, é possível observar que é comum a prática de internações que não são de curta duração, visto a média encontrada (6,8 dias). Na CMI, uma unidade utilizada prioritariamente para atendimento de pacientes em isolamento e precaução de contato, os pacientes de longa estadia ficam internados em média por 23,4 dias, muito mais alta do que a média das UTI-A e B, o que também aumenta o risco do ambiente, profissionais da saúde e visitantes à exposição por microrganismos multirresistentes que colonizam e infectam esses pacientes. A UTI-B, que atende pacientes em estado de saúde mais crítico, apresentou média de internação de 15,0 dias, maior do que o encontrado para a UTI-A (10,4 dias), que recebe pacientes em estado de saúde menos crítico.
- Uso de dispositivo invasivo: 65,2% (43/66) dos pacientes fizeram uso de pelo menos um dispositivo invasivo durante a internação, sendo que 83,7% (36/43) desses pacientes estavam em uso de sonda vesical.

Na Figura 12 estão disponíveis os dados referentes às IRAS reportadas e uso de antimicrobianos para o grupo de pacientes do presente estudo. É possível observar que 43,9% (29/66) dos pacientes apresentavam pelo menos uma IRAS diagnosticada, sendo as mais frequentes pneumonia, infecção do trato urinário e infecção de corrente sanguínea. Esses dados se correlacionam com aqueles apresentados na Figura 14, com fatores de risco como o uso de sonda vesical, respirador/ventilador mecânico e cateter venoso central; a média de internação para os pacientes com IRAS foi de 23,7 dias. O microrganismo mais frequentemente isolado nos casos de IRAS foi *A. baumannii* e *K. pneumoniae*: 30,0% e 26,7% dos pacientes com IRAS apresentavam essas duas espécies bacterianas, respectivamente. Um

outro dado importante da Figura 15 diz respeito ao consumo de antimicrobianos. Apesar da proporção de pacientes com IRAS ser pouco menor que 50,0%, 72,7% (48/66) dos pacientes estavam em uso de antimicrobianos, mostrando o uso dessa classe de fármacos para outras finalidades de tratamento ou profilaxia. Os antimicrobianos mais consumidos por esse grupo de pacientes foi a cefalosporina de amplo espectro, Ceftriaxona, a fluoroquinolona Ciprofloxacina, o carbapenêmico Meropenem e a penicilina associada a inibidor de beta-lactamase, Piperacilina/Tazobactam – antimicrobianos utilizados em tratamentos de infecções mais graves.

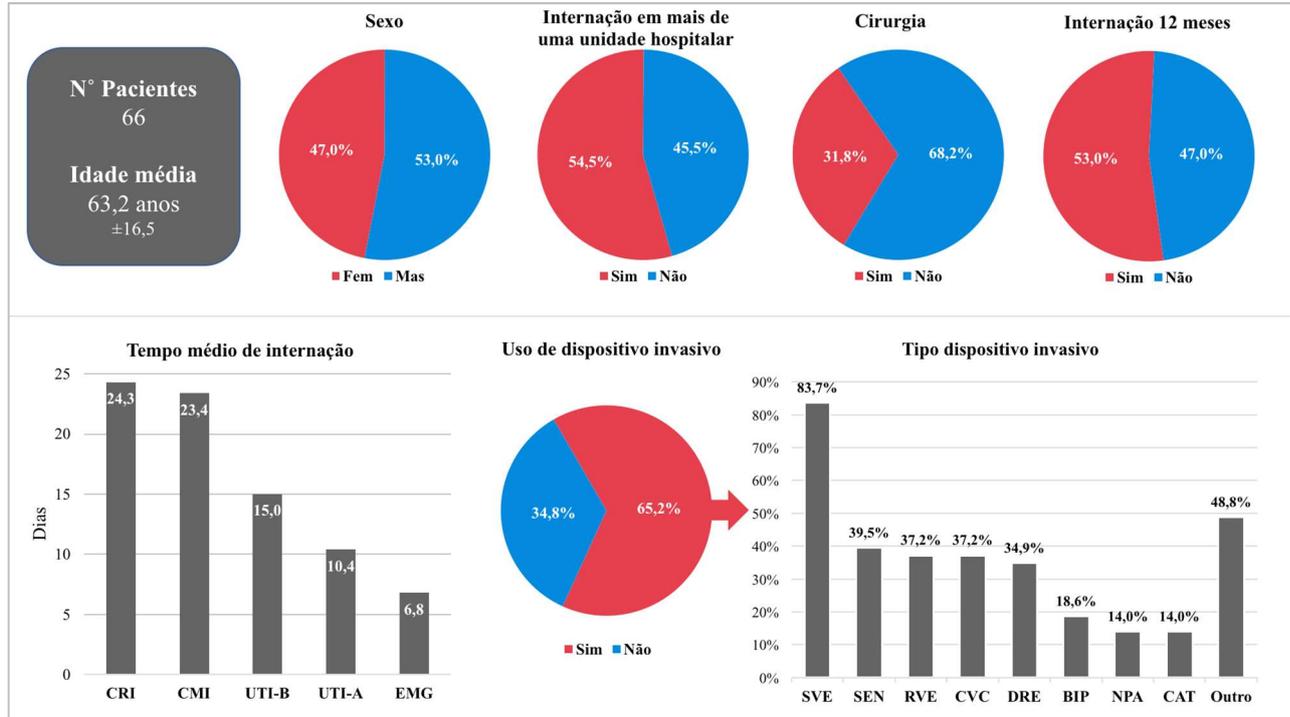
Todos os pacientes com IRAS estavam em tratamento com antimicrobianos, no entanto, em 89,6% (26/29) deles foi identificada um BGN MDR em pelo menos uma das amostras biológicas coletadas para o presente estudo, sendo que em 13 pacientes (44,8%) o BGN apresentou resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos conjuntamente. Em 55,2% (16/29) dos pacientes com IRAS foi isolada uma bactéria diferente daquela reportada no prontuário médico.

Para os pacientes que não apresentaram infecção (33/66) ou que estavam sabidamente colonizados (4/66), foi isolado pelo menos um BGN MDR em 43,2% (16/37) deles, sendo que em 18,9% (7/37) desses pacientes o BGN apresentou perfil MDR que incluía resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos.

No total, 62 pacientes (93,9%) apresentaram pelo menos um BGN isolado em suas amostras; em 42 pacientes (63,6%) foi isolado pelo menos um BGN MDR; 26 pacientes (39,4%) apresentaram pelo menos um BGN resistente às cefalosporinas de amplo espectro e em 19 (28,8%) foi encontrado um BGN resistente aos carbapenêmicos. Assim, esses foram os dados reais de colonização dos pacientes por Gram-negativos multirresistentes.

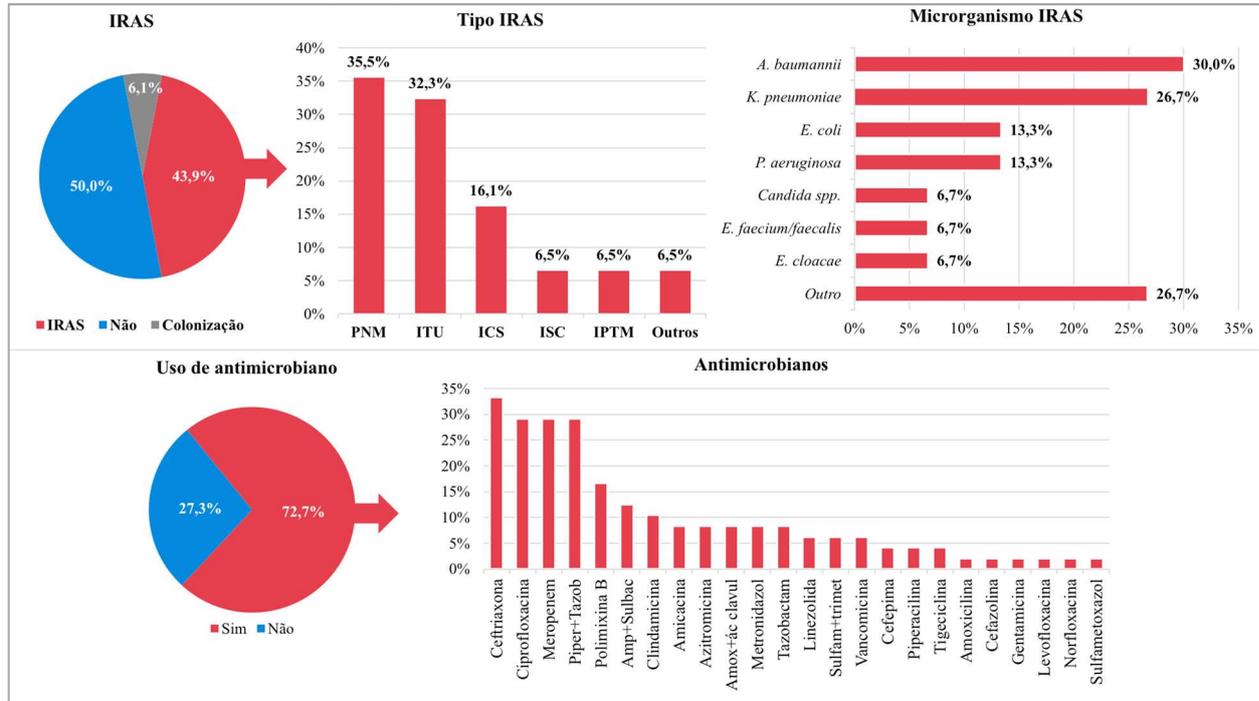
Como poderá ser visualizado em resultados apresentados nas próximas seções, há dispersão das bactérias identificadas nos pacientes, principalmente em seus leitos.

Figura 11. Caracterização do grupo de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados.



SVE: sonda vesical. SEN: sonda enteral. RVE: respirador ou ventilador mecânico. CVC: cateter venoso central. DRE: dreno; BIP: respirador tipo *bipap*. NPA: nutrição parenteral. CAT: outros cateteres.

Figura 12. Caracterização do grupo de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados e consulta a prontuários: diagnóstico de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) e uso de antimicrobianos.



PNM: pneumonia. ITU: infecção do trato urinário. ICS: infecção de corrente sanguínea. ISC: infecção de sítio cirúrgico. IPTM: infecção de pele e tecidos moles.

Nas Figuras 13 a 16 estão disponíveis os dados que permitem caracterizar o grupo de profissionais da saúde do presente estudo. Na Figura 13 estão disponíveis o número total de profissionais, sua média de idade e respectivo desvio padrão, a proporção entre os sexos e as profissões desses profissionais da saúde. O grupo foi composto majoritariamente por mulheres jovens, técnicas em enfermagem ou enfermeiros, no entanto, foi possível contar com uma diversidade considerável de profissões, representado o corpo de profissionais da saúde.

Na Figura 14 estão disponíveis dados sobre a prática de higienização das mãos. É possível observar uma boa instrução em relação à lavagem das mãos com água e sabonete antisséptico, porém foi relatada uma instrução um pouco menor para o uso de álcool em gel para higienização das mãos (20,8% dos profissionais relataram que não foram instruídos sobre esse procedimento específico). No entanto, 55,5% (40/72) dos profissionais observam que seus colegas não utilizam EPIs e não realizam a higienização de mãos adequadamente; segundo os próprios profissionais, o motivo principal é a não adesão às instruções fornecidas (45,8%), sendo que esse comportamento é identificado principalmente nos médicos e estudantes de medicina (segundo 85,0% e 60,0% dos profissionais que apontaram a não adesão, respectivamente). Os resultados apresentados na Figura 15 também demonstram uma boa instrução dos profissionais da saúde em relação às práticas que auxiliam o controle de IRAS, fornecida principalmente por cursos promovidos pela CCIH do hospital, mas também outras ações, como instruções fornecidas pelos profissionais que lideram as equipes de cada unidade hospitalar. No entanto, uma parcela considerável dos profissionais (33,3%) relatou a percepção de que essas informações não são suficientes para que possam colaborar mais ativamente no controle de IRAS.

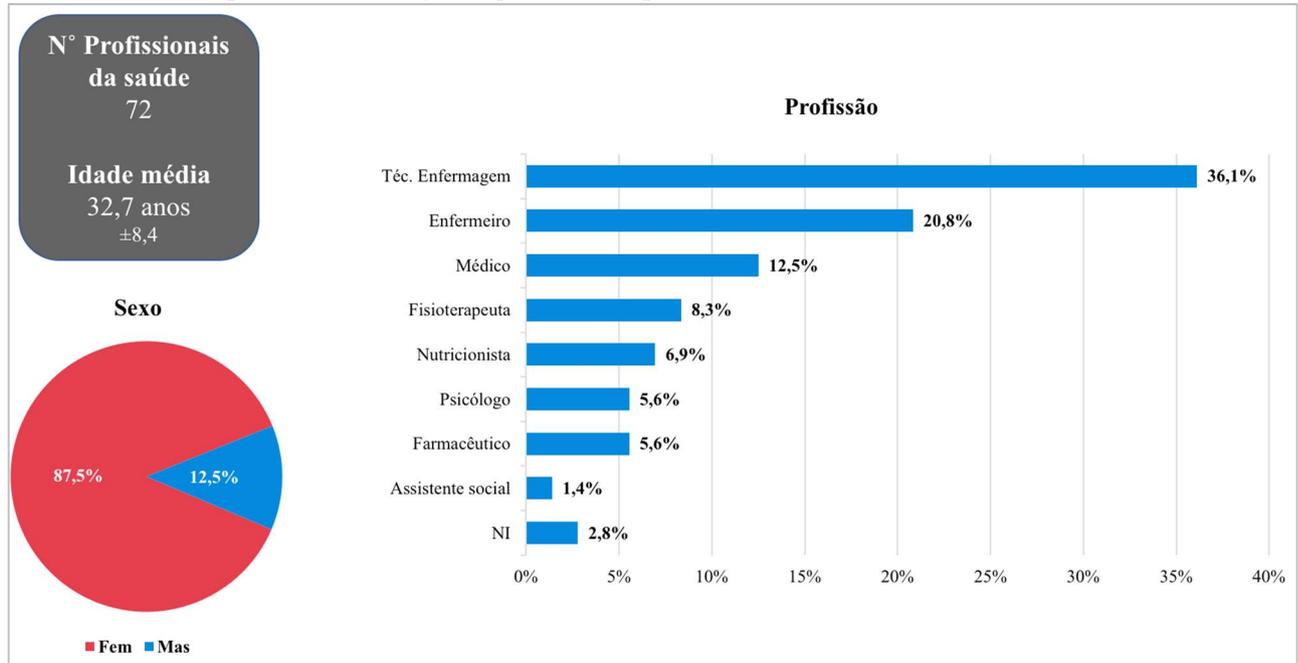
A Figura 16 traz dados sobre a percepção dos profissionais em relação às suas condições de trabalho. A maioria dos profissionais, 70,8% (51/72), julga que suas condições de trabalho não são adequadas. No questionário foram apontados possíveis motivos que poderiam justificar a falta de boas condições de trabalho, alguns gerais e outros mais específicos sobre o controle de IRAS – dentre essas opções, 60,8% dos profissionais apontaram a demora na identificação dos pacientes que estão com IRAS e conseqüentemente, que poderiam estar em precaução de contato. Para 51,0% deles há também falta de estrutura física hospitalar adequada. Dentre os motivos colocados como alternativas,

poucos profissionais tem a percepção de que há carga de trabalho excessiva (7,8%) e baixa remuneração (5,9%).

Dos 72 profissionais da saúde que participaram da presente pesquisa, 22 (30,5%) apresentaram pelo menos uma amostra positiva para BGN. Um dado interessante diz respeito às profissões desses profissionais de saúde: 12 (54,5%) eram técnicos de enfermagem e os demais (45,5%) eram farmacêuticos, fisioterapeutas, nutricionistas, psicólogos ou assistentes sociais; ou seja, apesar de menos numerosos, os profissionais dessas profissões apresentaram alta positividade para a presença de BGN. Nenhum médico ou enfermeiro apresentou amostras positivas para BGN (observação: houve representantes da classe de médicos e enfermeiros em todas as unidades hospitalares pesquisadas). Todos os BGN isolados apresentavam resistência às cefalosporinas de amplo espectro, sendo três deles MDR e resistentes aos carbapenêmicos, esses últimos obtidos a partir de amostras de um farmacêutico e dois fisioterapeutas (mãos e vestimenta).

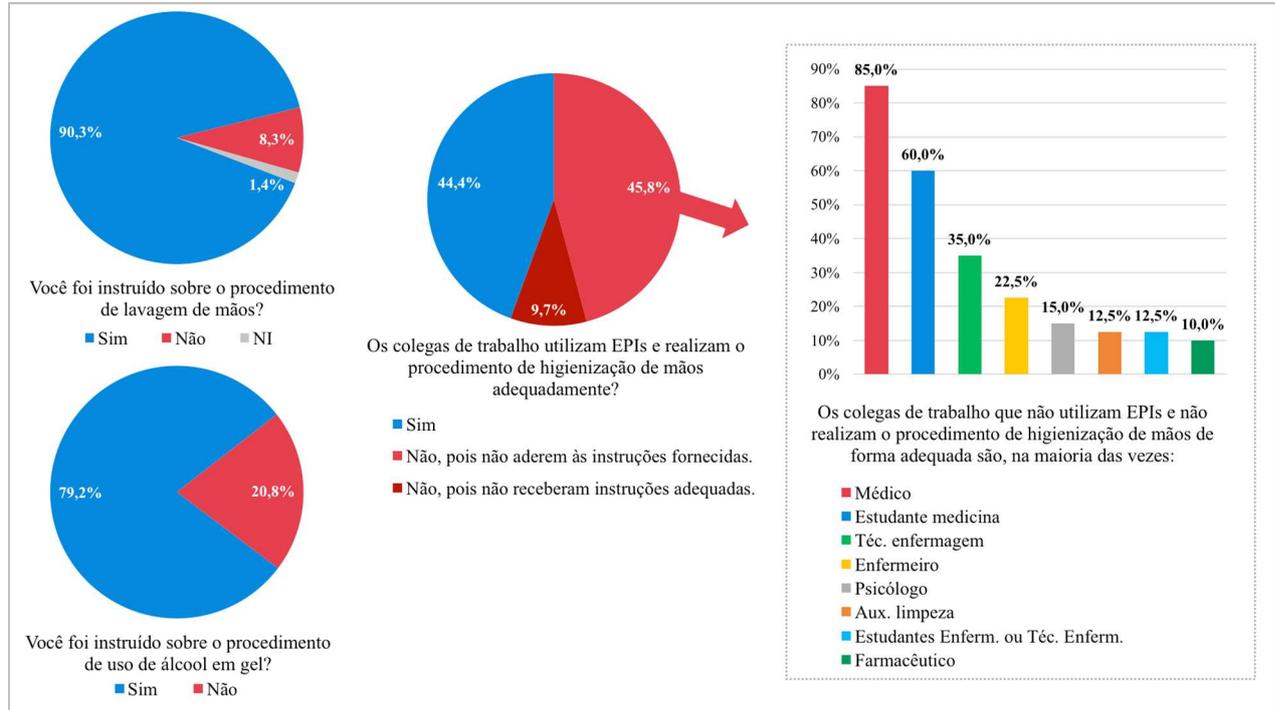
O questionário sobre o ambiente das unidades hospitalares foi respondido pelo líder de cada unidade, no primeiro e sexto mês de coleta de dados e amostras biológicas. Porém, as análises dos dados fornecidos demonstraram informações desconstruídas, sem padrão. Por exemplo, para as práticas de higienização concorrente e terminal de leitos, produtos utilizados, práticas de higienização de áreas comuns de trabalho, muitas respostas foram assinaladas como “Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos” ou “Não se aplica”. As informações quando foram trazidas também eram diferenciadas de uma unidade para outra, por exemplo, sobre a limpeza concorrente de leitos: em todas as unidades se relatou o uso de água e sabão (detergente neutro), porém os produtos utilizados na desinfecção variaram entre uma solução comercial de glucoprotamina, ácido peracético, desinfetante de uso geral e água sanitária (hipoclorito de sódio). No entanto, o procedimento operacional padrão divulgado pela CCIH preconiza o uso de água e detergente neutro (pano umedecido para limpeza da sujidade das superfícies) e a solução comercial de glucoprotamina para desinfecção, que é fornecida para todas as unidades. Os dados demonstram que os procedimentos utilizados em cada unidade podem não estar homogêneos, apontando a necessidade de treinamento das equipes sobre os procedimentos diversos de higienização e desinfecção.

Figura 13. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados.



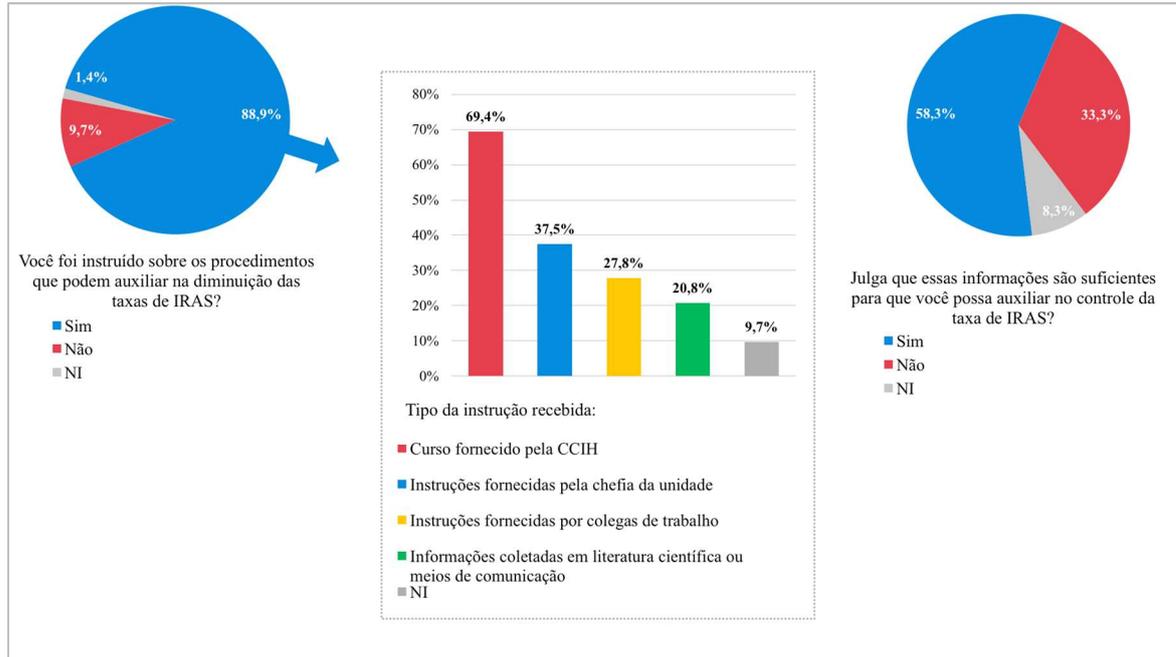
NI: não informado.

Figura 14. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: instrução sobre higienização de mãos.



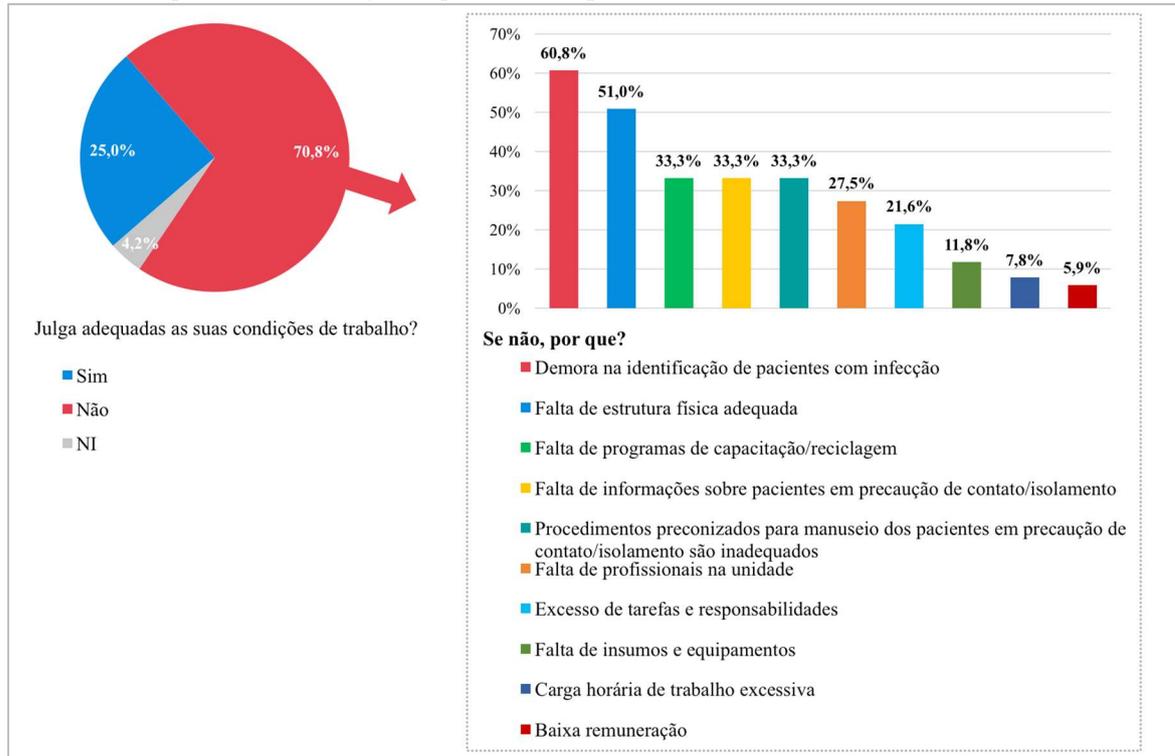
EPIs: equipamentos de proteção individual. NI: não informado.

Figura 15. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: instrução sobre controle de infecções relacionadas à assistências à saúde (IRAS).



NI: não informado.

Figura 16. Caracterização do grupo de profissionais da saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina incluídos no presente estudo, segundo questionários aplicados: condições de trabalho.



NI: não informado.

6.3.2 Identificação de pontos críticos de contaminação por bactérias associadas às IRAS

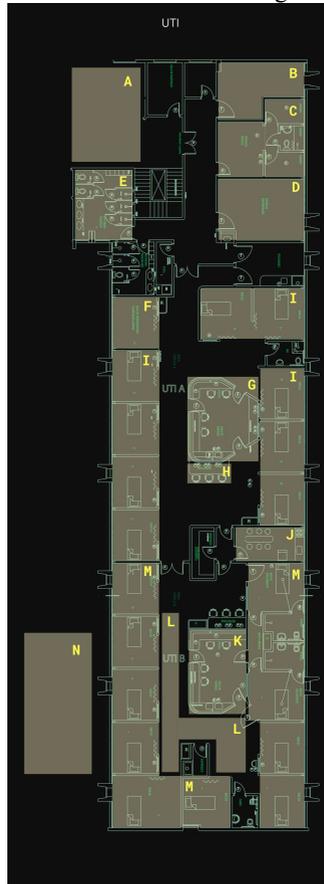
Os resultados apresentados nesta seção foram obtidos prioritariamente por meio das análises da abordagem não dependente de cultivo (NDC), porém, alguns resultados serão apresentados de forma paralela à abordagem dependente de cultivo (DC), como forma de avaliar a concordância dos resultados obtidos por meio das diferentes técnicas.

A partir dos dados gerados pelo sequenciamento de DNA de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA para as amostras NDC, foram elaborados mapas de risco (*heat maps*). Nas Figuras 17-18, 20-21, 23-28 estão disponíveis as plantas baixas e os mapas de risco para as unidades hospitalares analisadas nos meses de abril a setembro de 2015. Os mapas de risco foram elaborados utilizando-se o *software* Neobiome (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). A ferramenta possui filtros que permitem a visualização dos resultados para grupos bacterianos específicos (como as bactérias comumente associadas às IRAS, alvos da presente pesquisa) e foram estabelecidos de acordo dados de revisão de literatura (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). O filtro relacionado às IRAS foi utilizado para gerar grande parte das figuras e dados apresentados nesta seção de resultados; as espécies bacterianas que compõe esse filtro estão listadas no Anexo 4. Neste *software*, a coloração de cada ponto aponta a detecção de bactérias relacionadas à IRAS, variando de verde a vermelho, sendo a cor verde indicativa de um menor número de sequências (*reads*) de 16S rDNA, obtidas no sequenciamento de DNA para cada espécie bacteriana identificada, e a transição para a cor vermelha indicando um maior número de sequências. Além disso, a medida do raio do círculo indica o número de sequências de 16S rDNA consideradas, ou seja, quanto maior o raio, maior o número de sequências. Desta forma, os círculos em vermelho mostram os pontos de coleta que apresentaram as maiores cargas microbiológicas para bactérias associadas às IRAS. O ponto com o maior número de sequências de 16S rDNA é utilizado como uma referência, sendo que todas as demais amostras são comparadas de forma proporcional. Assim, as figuras permitem que seja estabelecido um padrão de contaminação de pacientes, ambiente e profissionais da saúde de forma comparativa e temporal para as espécies bacterianas de maior relevância no contexto das IRAS. Nas Figuras 18, 21, 24, 26 e 28 é possível observar, por

exemplo, uma clara recorrência de alguns pontos de coleta com presença de bactérias associadas às IRAS, que serão discutidos individualmente a seguir.

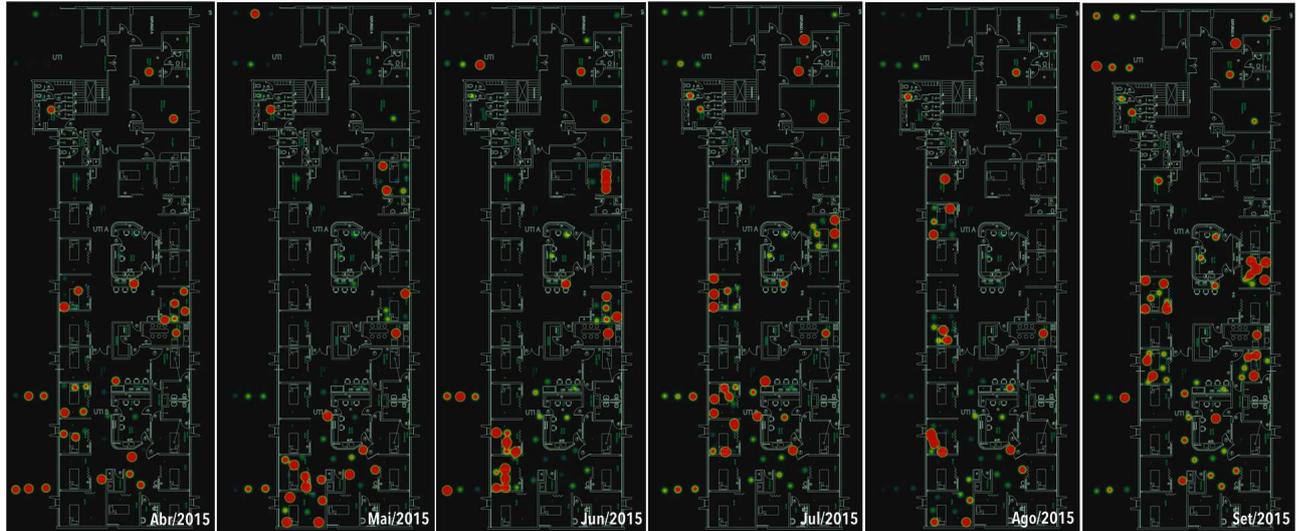
A cada mês, os pacientes de cada unidade, escolhidos a partir dos critérios de inclusão, tinham os seus leitos também selecionados para a coleta de amostras biológicas. Os pontos de coleta dentro dos leitos foram os mesmos ao longo do projeto, porém o leito se alterava, conforme a alocação do paciente participante do projeto do mês vigente. Dessa forma, deve-se ter cuidado ao analisar a recorrência dos pontos de calor (*hot spots*) nos leitos apresentados nos mapas de risco, pois somente dois (UTI-A, UTIB, CMI e CRI) a três (EMG) leitos foram amostrados a cada mês e suas localizações se alteram de um mês para outro pelos motivos expostos. Além disso, nos mapas de risco, os *hot spots* apresentados no interior do leito são correspondentes às amostras dos equipamentos de leito, do banheiro e também do próprio paciente. As amostras de pacientes foram sempre plotadas em cima do desenho da cama do leito e os equipamentos no seu entorno, no entanto, por vezes, os *hot spots* se unem, devido à alta quantidade de sequências geradas correspondentes às bactérias associadas às IRAS. Esse efeito ocorre em outros ambientes também. Em relação aos profissionais de saúde, representados sempre na parte de fora da planta baixa, uma vez que há ampla circulação dos mesmos na unidade hospitalar, as três amostras correspondentes a um profissional foram sempre plotadas em grupo (na vertical ou horizontal), sempre na mesma ordem - mãos, vestimenta e celular (de cima para baixo ou da direita para a esquerda).

Figura 17. Esquema da planta baixa das Unidades de Terapia Intensiva A e B do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.



A: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês - mãos, vestimenta e celular) da UTI-A. B: Sala de utilidades. C: Sala de repouso médico. D: Sala de repouso da enfermagem. E: Vestiário feminino (armários e banheiro). F: Sala de equipamentos G: Posto de enfermagem da UTI-A. H: Área de prescrição médica. I: Leitos da UTI-A (dois leitos amostrados a cada mês - equipamentos do leito e pacientes - reto, narinas e mãos). J: Copa. K: Posto de enfermagem da UTI-B. L: Equipamentos de uso comum. M: Leitos da UTI-B (dois leitos amostrados a cada mês - equipamentos do leito e pacientes - reto, narinas e mãos). N: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês - mãos, vestimenta e celular) da UTI-B.

Figura 18. Mapas de risco das Unidades de Terapia Intensiva A e B do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).



Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

Para as UTI-A (Figuras 17 e 18, leitos da parte superior do mapa) e UTI-B (Figuras 17 e 18, leitos da parte inferior do mapa), é possível visualizar a recorrência de *hot spots* nos dois leitos amostrados durante todos os meses, porém com destaque maior para a UTI-B. De fato, a UTI-B recebe pacientes em estado de saúde mais crítico, habitualmente com maior tempo de internação, o que explica o maior nível de contaminação do paciente e o seu entorno. Cita-se, como exemplo, um paciente do mês de agosto da UTI-B, internado há 10 dias no hospital que, segundo dados de prontuário médico, tratava-se de paciente pós-cirúrgico, com IRAS por *A. baumannii* com perfil sensível pelo TSA, colocado em precaução de contato: foi isolado do *swab* retal e também das grades de sua cama *K. pneumoniae* MDR, positiva para genes ESBL e *bla*_{KPC}-like, diferentemente do que havia sido reportado, mostrando uma nova colonização e que estava presente também no ambiente. Nesse exemplo, questiona-se se os isolados de *K. pneumoniae* poderiam ser os mesmos, de origem clonal, o que comprovaria a dispersão. Os dois isolados apresentam perfis de resistência idênticos, sendo um indicativo. A Figura 19 mostra o perfil genético da sequência de 16S rRNA (V3/V4) obtida pelo sequenciamento. Nessa imagem é possível visualizar cinco círculos, representando cinco tipos diferentes de sequências identificadas e todas elas estão presentes em ambas as amostras – observar os raios partindo de um dos círculos, que representa uma das sequências identificadas (um genótipo), e chegando até a periferia onde estão representadas as duas amostras em questão, mostrando que compartilham uma *K. pneumoniae* de genótipo (16S rRNA V3/V4) idêntico.

Em relação aos profissionais da saúde, também é possível observar *hot spots* maiores e mais recorrentes para os profissionais da UTI-B (parte inferior do mapa de risco). Como exemplo de possíveis falhas de higienização das mãos e frequência inadequada de troca de vestimenta privativa, aponta-se o isolamento (para que não haja dúvidas em relação à viabilidade celular) de *A. baumannii* MDR positiva para *bla*_{OXA-23}-like nas mãos de profissional da UTI-B e de *E. cloacae* MDR na vestimenta de profissional da UTI-A.

Outros *hot spots* que se destacam pela recorrência em todos os meses são aqueles referentes à Sala de repouso médico, Sala de repouso da enfermagem e a Copa – áreas comuns de descanso dos profissionais da saúde. A amostra do ambiente da Copa, por exemplo, foi coletada dos puxadores e botões (superfícies de alto contato) dos eletrodomésticos disponíveis, como o equipamento de micro-ondas, cafeteira, lancheira e geladeira, uma vez que são intensamente manipulados pelos

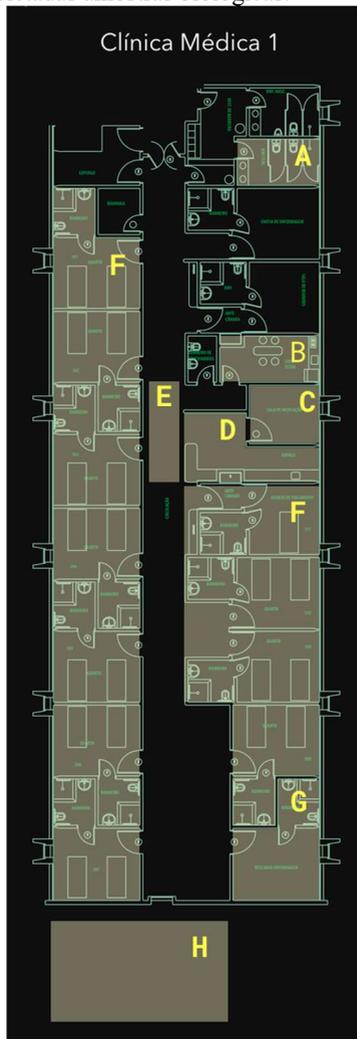
profissionais de saúde nos períodos de intervalo para lanches e refeições. Esse achado denota possível falha de higienização das mãos pelos profissionais e dos próprios equipamentos e se constituiu em um alerta para ocorrência de possíveis repositórios de bactérias importantes no contexto das IRAS. Por exemplo, nas amostras da Copa dos meses de abril, maio e agosto foram isoladas *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* MDR e positivas para dois ou mais genes codificantes de ESBL. Destaca-se também a recorrência de *hot spots* para os Equipamentos de uso comum, principalmente para a poltrona de fisioterapia e o carro de banho portátil, nos quais foram isoladas, em todos os meses, bactérias MDR, como *K. pneumoniae* (positiva para genes ESBL e *bla*_{KPC}-like) e *A. baumannii* (positiva para *bla*_{OXA-23}-like). Os dados obtidos a partir de amostras DC também puderam ser identificados a partir de amostras NDC.

Figura 19. Perfil genético de *Klebsiella pneumoniae* MDR identificadas em *swab* retal e grades de leito de paciente da Unidade de Terapia Intensiva-B (UTI-B) isoladas no mês de agosto.



Cada cor representa uma espécie bacteriana (vermelho = *Klebsiella pneumoniae*), cada círculo representa um mesmo genótipo de 16S rRNA V/V4. Na borda do círculo maior, onde os genótipos estão contidos, pode-se visualizar as amostras. De cada genótipo se abrem raios, partindo desse genótipo e indo ao encontro das amostras, na periferia, identificando as amostras nas quais esse genótipo foi encontrado. Assim, é possível identificar que uma espécie bacteriana geneticamente semelhante está presente em diferentes amostras, o que permite inferir a dispersão do microrganismo. Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

Figura 20. Esquema da planta baixa da Clínica Médica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.



A: Vestiário feminino (armários e banheiro). B: Copa. C: Sala de medicamentos. D: Posto de enfermagem. E: Equipamentos de uso comum. F: Leitos (dois leitos amostrados a cada mês – equipamentos do leito e pacientes – reto, narinas e mãos). G: Sala de repouso da enfermagem. H: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês – mãos, vestimenta e celular).

Figura 21. Mapas de risco da Clínica Médica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).



Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

Na Clínica Médica I (CMI), assim como nas demais unidades, será possível notar padrões de contaminação semelhantes aos apresentados para a UTI adulto. Na CMI também se destacam *hot spots* maiores e recorrentes nas amostras dos profissionais da saúde, Leitos, Copa, além do Repouso médico e Repouso da enfermagem (Figuras 20 e 21), com isolamento, por exemplo, de *E. cloacae* ESBL na vestimenta de profissionais e *S. marcescens* MDR e *K. pneumoniae* ESBL na Copa. Porém, apesar do padrão semelhante, a CMI apresentou uma característica diferente das demais unidades hospitalares: por meio da abordagem NDC, obteve-se maior recuperação de bactérias associadas às IRAS e com perfis de resistência aos antimicrobianos, do que o obtido pela abordagem DC. Serão trazidos abaixo alguns exemplos (para isolamento/detecção de *K. pneumoniae* e *A. baumannii*):

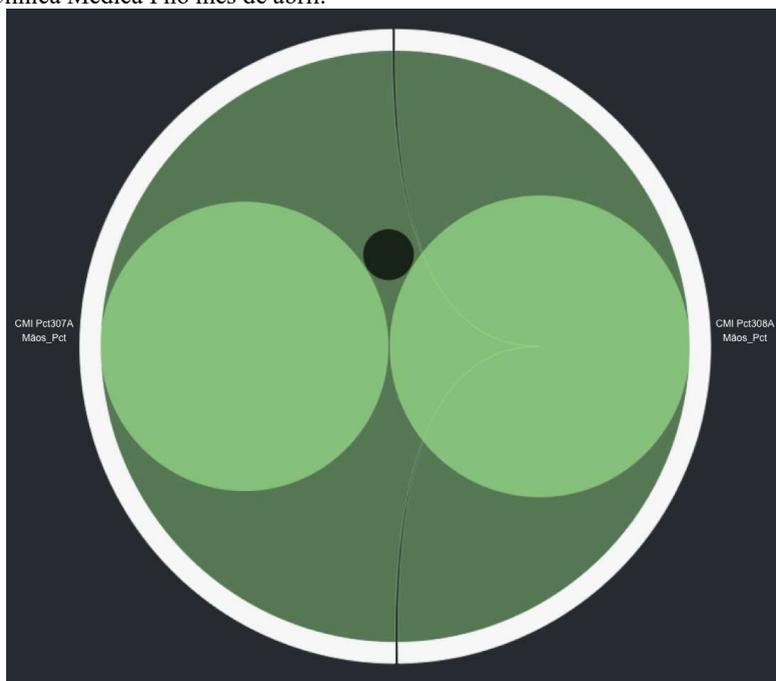
1. Paciente A: isolamento (DC) de *K. pneumoniae* MDR positiva para *bla*_{KPC-like} e *A. baumannii* MDR positiva para *bla*_{OXA-23-like} na amostra de *swab* retal. O método NDC identificou essas bactérias no *swab* retal, mas também *A. baumannii* positiva para *bla*_{OXA-23-like} no *swab* das mãos.
2. Paciente B: isolamento (DC) de *K. pneumoniae* MDR positiva para *bla*_{KPC-like} nas amostras de *swab* retal, mãos e narina. O método NDC identificou *K. pneumoniae bla*_{KPC-like} positivo nessas mesmas amostras, mas também na amostra de equipamentos do leito (parede de gases e suporte de soro).
3. Paciente C: isolamento (DC) de *K. pneumoniae* MDR positiva para *bla*_{KPC-like} na amostra de *swab* retal. O método NDC identificou *K. pneumoniae bla*_{KPC-like} positivo na amostra de *swab* retal, mas também na amostra de *swab* das mãos.
4. Paciente D: isolamento (DC) de *A. baumannii* MDR positiva para *bla*_{OXA-23-like} na amostra de *swab* nasal e de *K. pneumoniae* MDR positiva para *bla*_{KPC-like} na amostra das grades da cama de sua cama (porém essa última bactéria não foi isolada nas amostras do paciente). O método NDC identificou *K. pneumoniae bla*_{KPC-like} positivo na amostra das grades da cama, mas também nas amostras do paciente, tanto no *swab* retal, como no nasal e das mãos, além de *A. baumannii* positiva para *bla*_{OXA-23-like} na amostra de *swab* nasal.
5. Paciente E: amostra NDC do *swab* retal com presença de *K. pneumoniae bla*_{KPC-like} positivo, não isolada na amostra DC correspondente.
6. Paciente F e G: amostras NDC dos *swabs* das mãos com presença de *A. baumannii* positiva para *bla*_{OXA-23-like}, não isolada nas

amostras DC correspondentes. A Figura 22 mostra o perfil genético do 16S rRNA V3/V4 idêntico identificado no sequenciamento dessas duas amostras.

Observação: para amostras biológicas que não puderam ser coletadas de forma simultânea para as abordagens DC e NDC (como *swab* retal e *swab* nasal), deu-se preferência pela coleta do *swab* destinado à abordagem DC primeiramente e posterior coleta do *swab* destinado à abordagem NDC.

Cabe ressaltar ainda que os dados trazidos possuem uma importância especial devido ao fato da CMI ser utilizada como uma unidade de isolamento para o HU-UFSC (de forma a concentrar os cuidados aos pacientes em isolamento e precaução de contato), necessitando, portanto, de uma identificação precisa em relação ao nível de risco de contaminação dos pacientes internados e do seu ambiente.

Figura 22. Perfil genético de *Acinetobacter baumannii* identificada em *swab* das mãos (amostras não dependentes de cultivo – NDC) de dois pacientes da Clínica Médica I no mês de abril.



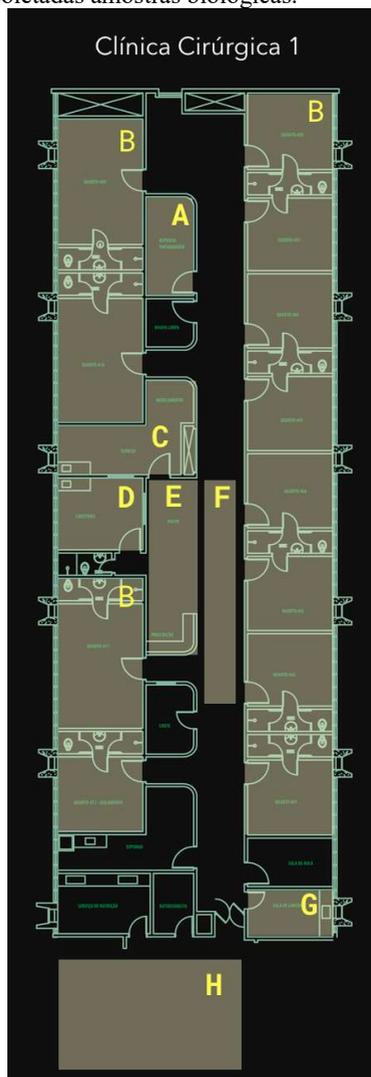
Cada cor representa uma espécie bacteriana (verde = *Acinetobacter baumannii*), cada círculo representa um mesmo genótipo de 16S rRNA V/V4. Na borda do

círculo maior, onde os genótipos estão contidos, pode-se visualizar as amostras. De cada genótipo se abrem raios, partindo desse genótipo e indo ao encontro das amostras, na periferia, identificando as amostras nas quais esse genótipo foi encontrado. Assim, é possível identificar que uma espécie bacteriana geneticamente semelhante está presente em diferentes amostras, o que permite inferir a dispersão do microrganismo. Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

Na Clínica Cirúrgica I (CRI) a recorrência de *hot spots* foi semelhante ao padrão da UTI e CMI (Figuras 23 e 24). No entanto, as bactérias apresentaram uma taxa menor de resistência (classificação do TSA), bem como menor frequência de genes de resistência aos carbapenêmicos, em comparação ao encontrado na UTI e CMI, um dado positivo se for levado em consideração que essa unidade foi a que apresentou o maior tempo de internação relativo aos pacientes participantes do projeto (24,3 dias). Alguns pontos que merecem destaque: ocorrência *A. baumannii* MDR positiva *bla*_{OXA-23-like} na Sala de repouso da enfermagem e no Posto de enfermagem.

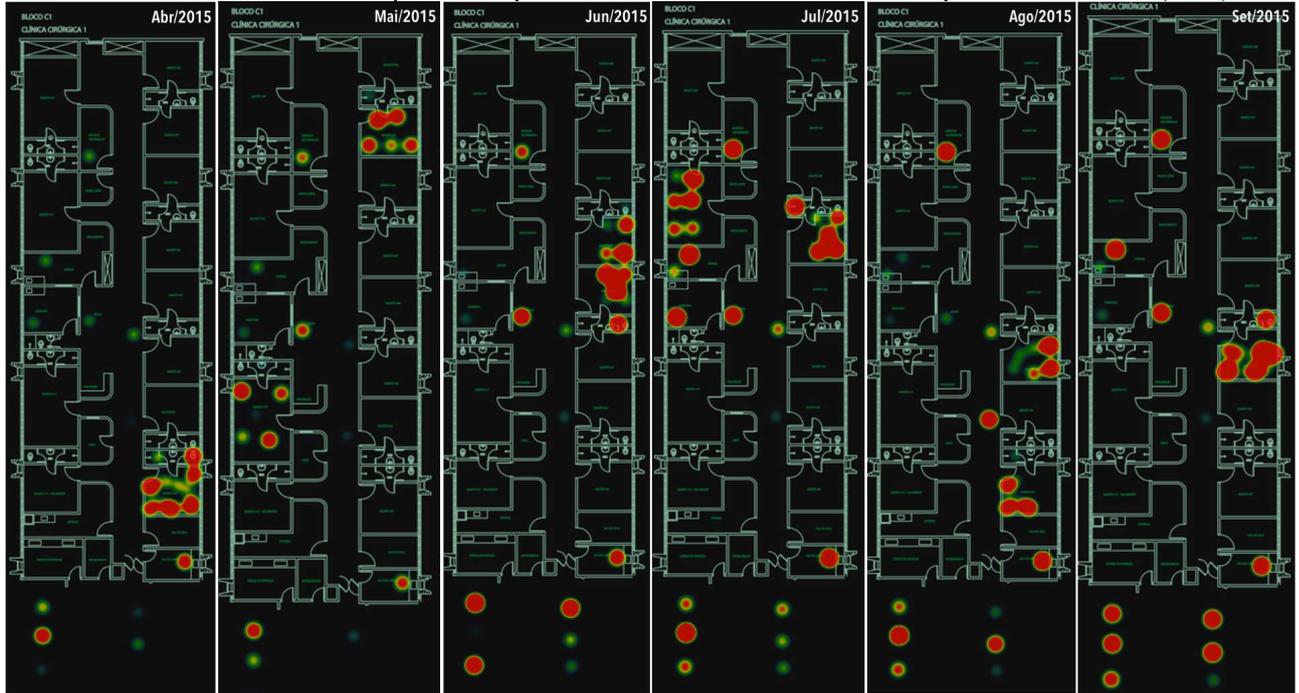
O Centro Cirúrgico (CC) possui relação mais estreita com a CRI, devido ao maior fluxo de pacientes entre essas unidades. O CC foi a unidade com menor recorrência de *hot spots*, ou seja, menor presença de bactérias associadas às IRAS (Figuras 25 e 26), e menor detecção de resistência aos antimicrobianos. Porém, são exceções a essa observação as amostras dos Profissionais da saúde, da Copa e do Repouso médico, nas quais há *hot spots* importantes e recorrentes. As amostras das salas cirúrgicas de julho e agosto também se destacam – em agosto a sala que apresentou a maior quantidade de bactérias associadas às IRAS foi a sala limpa e não a sala em uso, como nos demais meses, apontando para possível falha pontual na higienização da mesma. Foi identificada no CC apenas uma bactéria com perfil MDR ao longo de todo o semestre, uma *S. marcescens* MDR presente no vestiário feminino. Para a detecção de genes de resistência, destaca-se *bla*_{OXA-23-like} em espécies de *Acinetobacter* não pertencentes ao complexo Abc e em um mesmo tipo de amostra – vestimenta privativa dos profissionais da saúde e Repouso médico – em quatro oportunidades diferentes. Na Copa, foram identificadas com maior frequência enterobactérias com genes ESBL.

Figura 23. Esquema da planta baixa da Clínica Cirúrgica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.



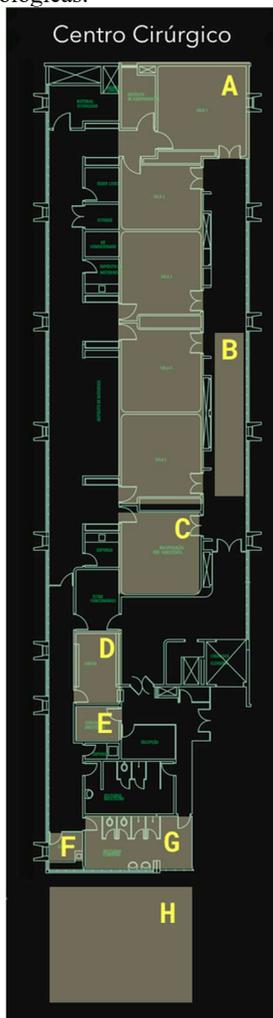
A: Sala de repouso da enfermagem. B: Leitos (dois leitos amostrados a cada mês – equipamentos do leito e pacientes – reto, narinas e mãos). C: Sala de medicamentos. D: Sala de curativos. E: Posto de enfermagem. F: Equipamentos de uso comum. G: Copa. H: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês – mãos, vestimenta e celular).

Figura 24. Mapas de risco da Clínica Cirúrgica I do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).



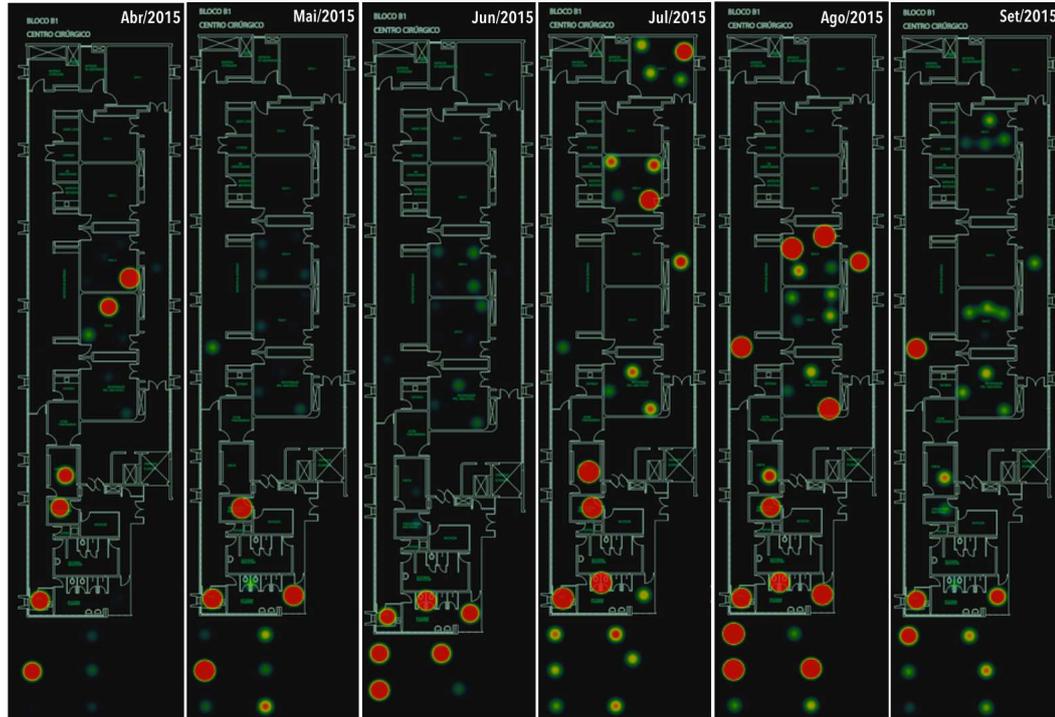
Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

Figura 25. Esquema da planta baixa do Centro Cirúrgico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.



A: Salas cirúrgicas (duas salas, uma em uso e outra higienizada, amostradas aleatoriamente a cada mês). B: Macas. C: Sala de recuperação pós-anestésica. D: Sala de repouso médico. E: Chefia da enfermagem (computador). F: Copa. G: Vestiário feminino (armários e banheiro). H: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês – mãos, vestimenta e celular).

Figura 26. Mapas de risco do Centro Cirúrgico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).



Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

A EMG também apresentou recorrência de *hot spots*, com destaque para os Leitões, Consultório médico, Sala de medicação de pacientes e Posto de enfermagem (Figuras 27 e 28). Destaca-se a detecção incomum de *Yersinia enterocolitica* group MDR na Copa, porém, a espécie não foi confirmada pelo sequenciamento do 16S rRNA. Apesar de ter sido a unidade que, proporcionalmente, apresentou a maior quantidade de *hot spots* recorrentes e maior quantidade de BGN isolados, a EMG foi a unidade que apresentou a menor proporção de bactérias MDR, resistentes aos carbapenêmicos e positivas para genes de resistência aos antimicrobianos (com exceção do CC). Entre as bactérias MDR isoladas na EMG, destacam-se espécies diversificadas da família Enterobacteriaceae – nas demais unidades é mais comum encontrar uma ou duas espécies mais prevalentes associadas ao perfil MDR. Na EMG também foi encontrada uma discordância marcante entre as abordagens DC e NDC: houve detecção mais frequente de *bla*_{OXA-23-like} em amostras NDC, que apresentavam espécies de *Acinetobacter* não pertencentes ao complexo Abc (principalmente *A. lwoffii* e *A. radioresistens*). Esse fato pode ser devido à dificuldade de isolamento dessas espécies bacterianas pelos métodos tradicionais, mas também características da própria unidade, já que nas demais não houve detecção frequente desse gene de resistência em espécies não-Abc (as demais unidades possuem maior prevalência de *A. baumannii*). Esses resultados podem ser explicados pelo maior fluxo e rotatividade de profissionais, pacientes e visitantes na EMG, em períodos mais curtos (tempo de internação médio é o menor de todas as unidades – 6,7 dias).

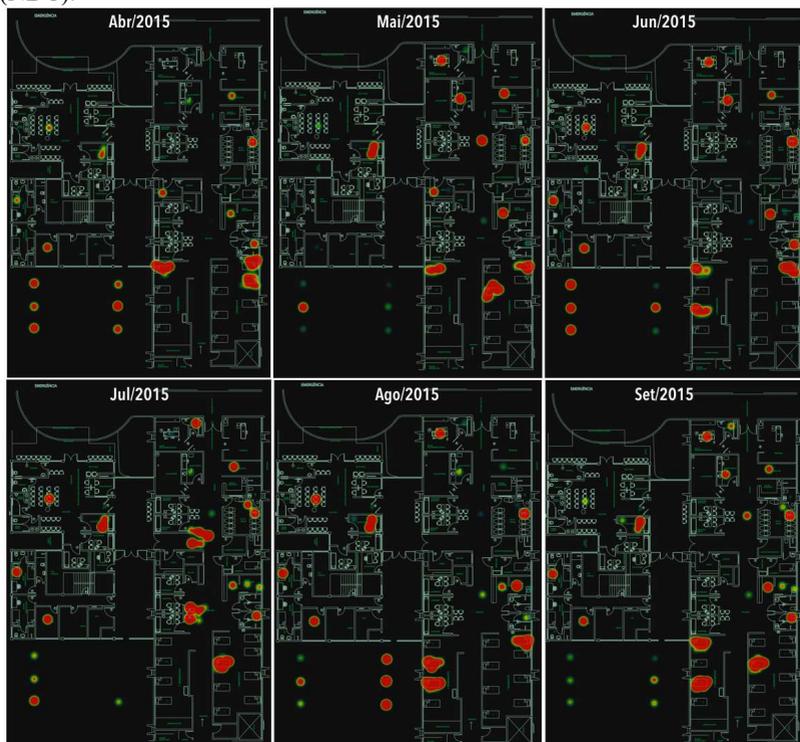
Para destacar um último ponto comum a todas as unidades: amostras de profissionais da saúde – é possível observar *hot spots* maiores e também mais recorrentes para as amostras das mãos e vestimenta do que para a amostra do telefone celular.

Figura 27. Esquema da planta baixa da Emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, com destaque para as áreas em que foram coletadas amostras biológicas.



A: Sala de procedimentos especiais. B: Sala de curativos. C: Área de prescrição médica. D: Sala de medicação. E: Equipamentos de uso comum. F: Sala de medicamentos. G: Posto de enfermagem. H: Leitos (três leitos amostrados a cada mês – equipamentos do leito e pacientes – reto, narinas e mãos). I: Recepção. J: Consultório médico. K: Sala de repouso da enfermagem. L: Copa. M: Profissionais da saúde (dois profissionais amostrados a cada mês – mãos, vestimenta e celular).

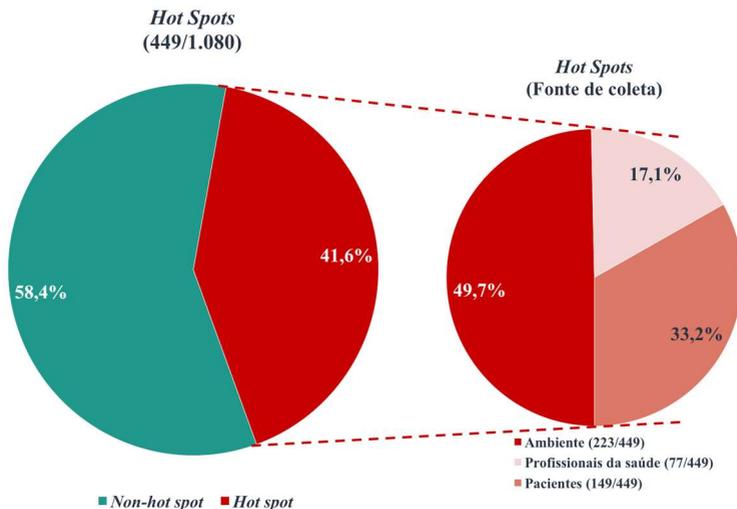
Figura 28. Mapas de risco da Emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, obtidos de abril a setembro de 2015 a partir do sequenciamento de DNA de amostras não dependentes de cultivo (NDC).



Fonte: Neobiome, Neoprospecta Microbiome Technologies.

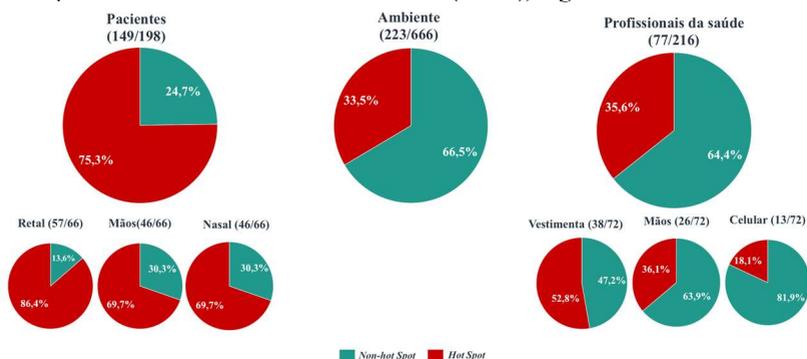
Após análise dos padrões de contaminação em cada unidade hospitalar, realizou-se uma abordagem para determinação dos pontos críticos de contaminação a partir das análises das amostras NDC. Para isso, adotou-se, primeiramente, um ponto de corte arbitrário, que agrupasse as amostras como “*hot spots*” ou “*non-hot spots*”, denotando a presença ou ausência de uma quantidade “relevante” de bactérias associadas às IRAS – de forma a classificar uma amostra como *hot spot* por meio de um ponto de corte quantitativo, o que permite uma comparação entre as amostras que não é somente visual, como observado nos mapas de risco. O ponto de corte estabelecido foi: amostras que apresentaram uma quantidade de sequências (*reads*) de 16S rDNA relativas às bactérias associadas às IRAS $\geq 1,0\%$ do total de sequências obtidas no sequenciamento para todas as amostras coletadas no mês vigente, para esse grupo bacteriano, foram classificadas como *hot spots*; se o total foi abaixo de $1,0\%$, as amostras foram classificadas como *non-hot spots*. Nas Figuras 29 e 30 é possível visualizar a proporção de amostras NDC classificadas como *hot spots* e *non-hot spots*.

Figura 29. Classificação das amostras não dependentes de cultivo (NDC) como “*hot spots*” ou “*non-hot spots*” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).



À esquerda pode ser visualizada a proporção global, enquanto que à direita as amostras classificadas como *hot spots* foram agrupadas segundo a fonte de coleta (ambiente, pacientes e profissionais da saúde).

Figura 30. Classificação das amostras não dependentes de cultivo (NDC) como “*hot spots*” ou “*non-hot spots*” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo a fonte de coleta.

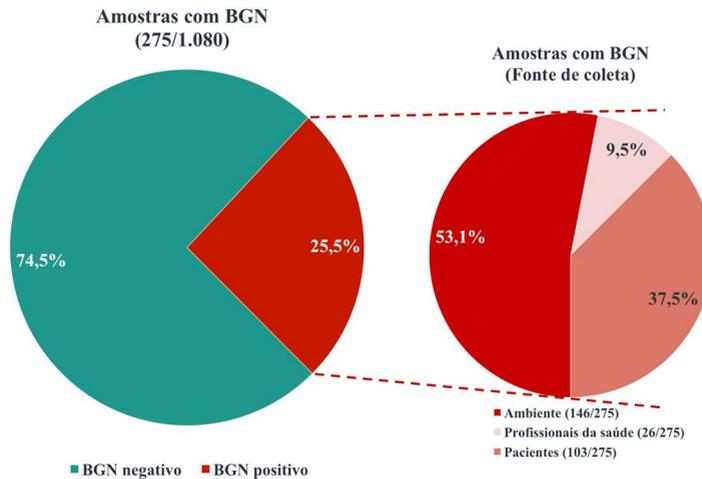


Na parte superior podem ser visualizadas as proporções globais para amostras coletadas de pacientes, do ambiente hospitalar e de profissionais da saúde. Na parte inferior, as amostras de pacientes e profissionais da saúde foram estratificadas segundo os diferentes sítios de coleta.

Mais de 40,0% de todas as amostras NDC coletadas durante o primeiro semestre de rastreamento foram classificadas como *hot spots*. Proporcionalmente, os pacientes foram aqueles que apresentaram a maior quantidade de amostras classificadas como *hot spots*, com mais de 75,0% das amostras dos três sítios de coleta apresentando uma quantidade relevante de bactérias associadas às IRAS, conforme o ponto de corte adotado. Chama a atenção a alta proporção (próxima a 70,0%) de amostras de pacientes coletadas das mãos e das narinas classificadas como *hot spots*, o que demonstra a colonização homogênea desses diferentes sítios e não ficando muito abaixo do que foi encontrado para os *swabs* retais, que tiveram pouco mais de 85,0% das amostras classificadas como *hot spots*. Os profissionais da saúde e o ambiente tiveram mais de 30% das amostras classificadas como *hot spots*, sendo que nos profissionais a maior proporção foi encontrada na vestimenta, seguida das mãos e celulares (tendência observada anteriormente pela análise dos mapas de risco).

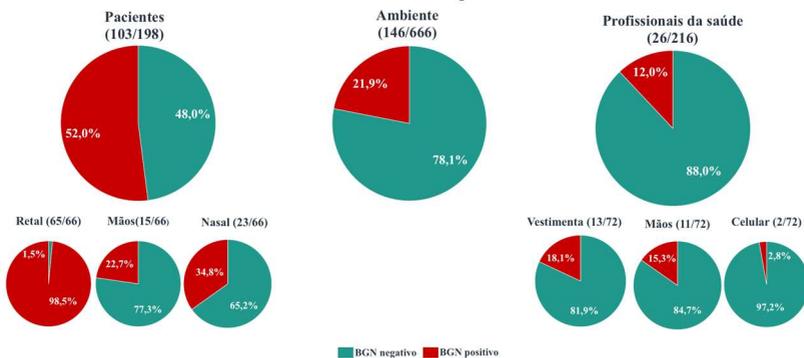
Os resultados encontrados para as amostras NDC se assemelham ao que foi encontrado para as amostras DC. Nas Figuras 31 e 32 é possível visualizar a proporção de amostras DC nas quais foram obtidos isolados de bacilos Gram-negativos (BGN).

Figura 31. Proporção de amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).



À esquerda pode ser visualizada a proporção global, enquanto que à direita as amostras positivas para BGN foram agrupadas segundo a fonte de coleta (ambiente, pacientes e profissionais da saúde).

Figura 32. Proporções das amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo a fonte de coleta.



Na parte superior podem ser visualizadas as proporções globais para amostras coletadas de pacientes, do ambiente hospitalar e de profissionais da saúde. Na parte inferior, as amostras de pacientes e profissionais da saúde foram estratificadas segundo os diferentes sítios de coleta.

Mais de 25% das amostras DC apresentaram pelo menos um isolado de BGN. Assim como na identificação dos *hot spots*, os pacientes foram aqueles que apresentaram a maior quantidade de amostras positivas para BGN, porém com algumas diferenças nas distribuições entre as amostras dos diferentes sítios de coleta. Amostras de *swab* das mãos, por exemplo, apresentaram positividade para BGN em 22,7% dos casos, enquanto que quase 70,0% das amostras correspondentes NDC foram classificadas como *hot spots*. Essas diferenças podem ser relacionadas, principalmente, ao fato de o ponto de corte adotado para classificação das amostras NDC (*hot spots*) ser quantitativo, enquanto que no caso das amostras DC, as proporções são relativas a dados qualitativos (presença ou ausência de BGN). Além disso, há também o fato de que para as amostras NDC foram avaliadas todas as bactérias relevantes no contexto das IRAS, Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto que para as amostras DC, foram avaliadas somente as bactérias Gram-negativas (sabidamente, amostras de pele possuem maior prevalência de bactérias Gram-positivas). É possível observar também, que há uma maior recuperação de bactérias associadas às IRAS pelos métodos sem cultivo. Mesmo com essas diferenças, os dados globais, obtidos a partir de uma ou outra abordagem, levam às mesmas conclusões: os pacientes, seguidos do ambiente e profissionais da saúde, apresentaram as maiores proporções de amostras com BGN ou bactérias associadas às IRAS. Amostras de *swab* nasal apresentaram BGN de forma relevante (quase 35% das amostras foram positivas). Nas amostras de profissionais, destaca-se, também pelo método DC, as vestimentas dos profissionais, corroborando os dados encontrados para as amostras NDC.

Na Figura 33 podem ser visualizadas as proporções de amostras do ambiente hospitalar que foram classificadas como *hot spots*, pelo método NDC, e na Figura 34 são apresentadas as proporções de amostras nas quais foram identificados BGN, pelo método DC. Fica evidente como ambas as técnicas puderam recuperar os mesmos resultados, identificando as áreas de descanso dos profissionais, banheiros de pacientes e áreas de trabalho dos profissionais como os pontos de maior contaminação por bactérias associadas às IRAS, enquanto que os equipamentos do CC se mostraram menos contaminados.

Figura 33. Proporções de grupos de amostras do ambiente e equipamentos hospitalares, não dependentes de cultivo (NDC), classificadas como “*hot spots*” para a presença de bactérias associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

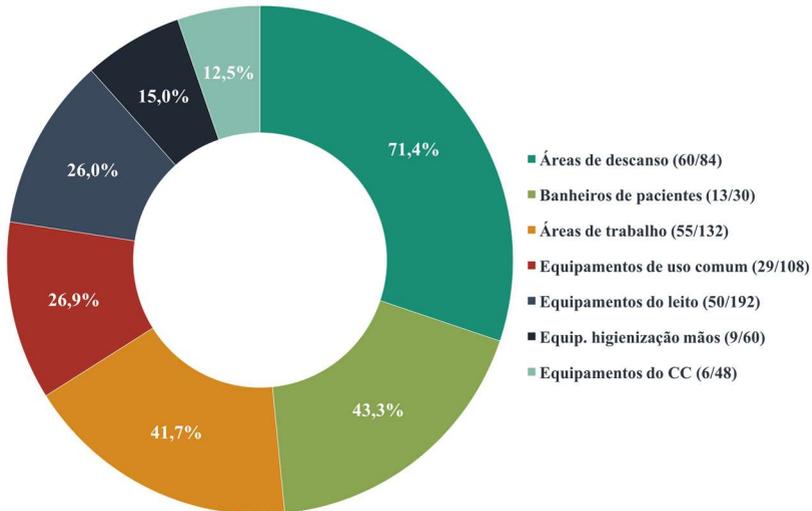
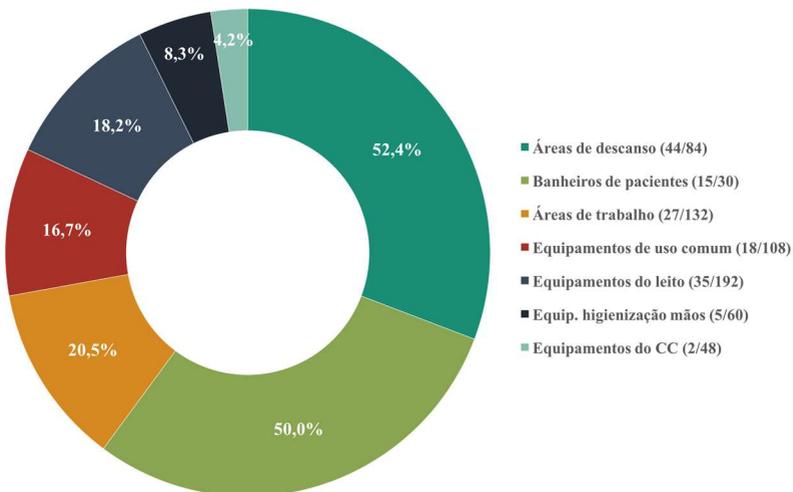
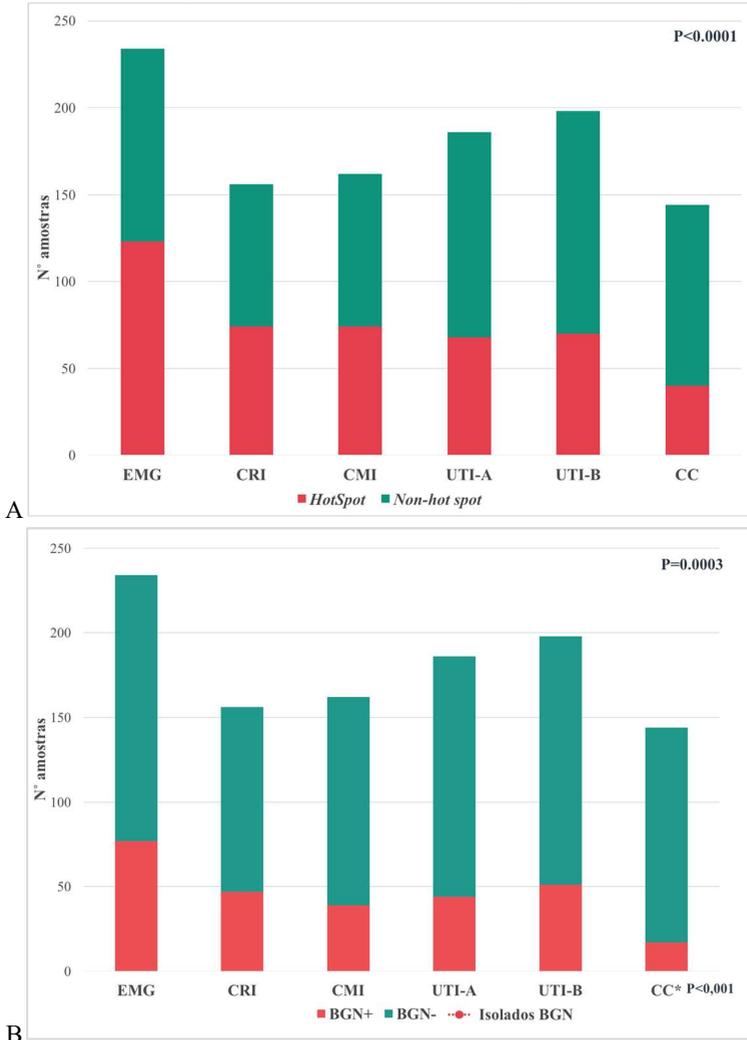


Figura 34. Proporções de grupos de amostras do ambiente e equipamentos hospitalares, dependentes de cultivo (DC), coletadas no primeiro semestre de análises e positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).



Na Figura 35 as amostras NDC classificadas como *hot spots* estão distribuídas nas unidades hospitalares pesquisadas e, em comparação, são mostradas as amostras DC positivas para BGN e os respectivos números de isolados obtidos. A EMG foi a unidade que, proporcionalmente, apresentou a maior quantidade de *hot spots*, corroborando os dados de isolamento de BGN (também com a maior proporção na EMG). A CRI e CMI apresentaram proporções semelhantes de amostras classificadas como *hot spots* em relação à EMG. UTI-A e UTI-B não mostraram diferenças entre si quanto à proporção de *hot spots*. O centro cirúrgico (CC), conforme o esperado, apresentou a menor proporção de *hot spots* (também corroborando os dados de isolamento de BGN no CC). O CC foi a única unidade em que não foram coletadas amostras de pacientes, o que colaborou para essa menor proporção. Esses resultados demonstram a disseminação de bactérias associadas às IRAS de forma homogênea pelas diferentes unidades hospitalares.

Figura 35. Proporções das amostras não dependentes de cultivo (NDC) classificadas como “hot spots” ou “non-hot spots” e proporções das amostras dependentes de cultivo (DC) positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN), segundo as diferentes unidades hospitalares.

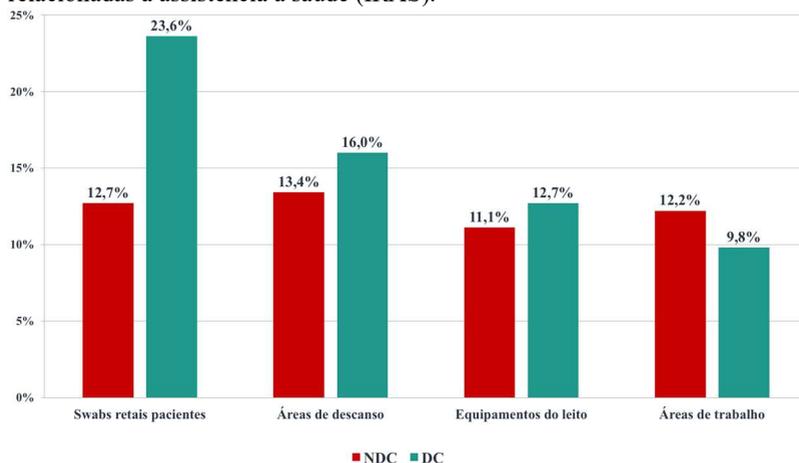


A: Proporções das amostras NDC classificadas como “hot spots” ou “non-hot spots”. B: Proporções das amostras DC positivas para a presença de BGN. CMI: clínica médica I; CRI: clínica cirúrgica I; UTI: unidade de terapia intensiva; EMG: emergência; CC: centro cirúrgico.

A avaliação da recorrência de *hot spots* nas amostras NDC e da recorrência de positividade para BGN nas amostras DC permitiu identificar os pontos críticos de contaminação (PCC), que podem ser visualizados na Figura 36. O ranqueamento dos conjuntos de amostras mais críticos em relação à recorrência de contaminações por bactérias associadas às IRAS foi o mesmo para ambas as técnicas, apenas com troca de posições:

- áreas de descanso dos profissionais da saúde;
- *swabs* retais de pacientes;
- áreas de trabalho dos profissionais da saúde;
- equipamentos de leitos de pacientes.

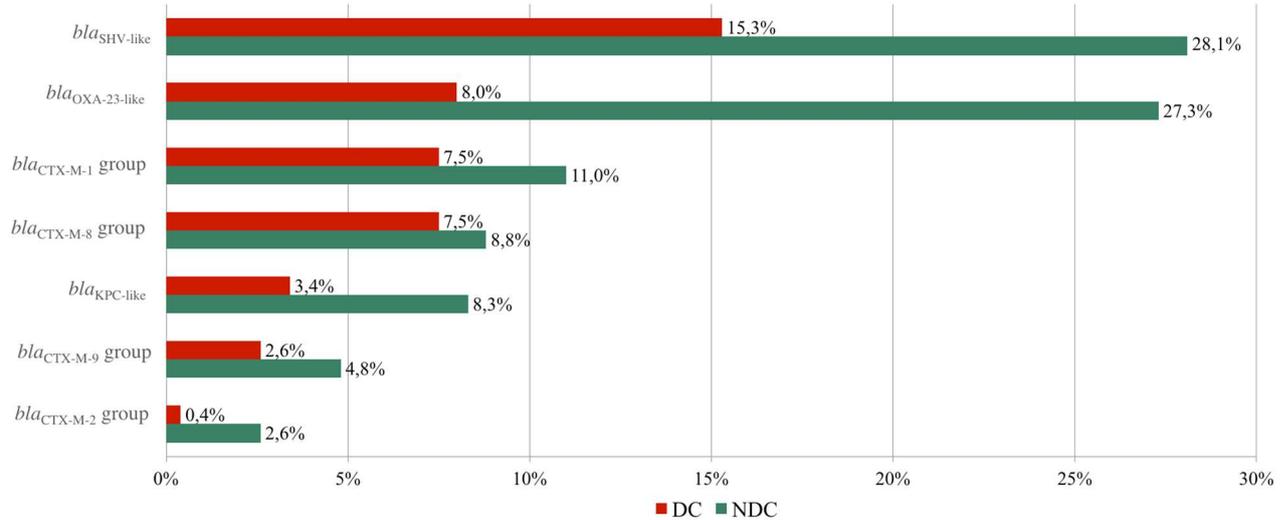
Figura 36. Proporções dos Pontos Críticos de Contaminação (PCC) para os grupos de amostras não dependentes de cultivo (NDC), de acordo com a recorrência de “*hot spots*”, e dependentes de cultivo (DC), de acordo com a presença de bacilos Gram-negativos (BGN) associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).



Os resultados encontrados chamam à atenção para um dado preocupante: áreas adjacentes aos leitos de pacientes, dentro das unidades hospitalares, podem se constituir em reservatórios latentes para bactérias associadas às IRAS, o que, conectado com falhas de processos de higienização ambientais e das mãos pelos profissionais da saúde, podem colocar em risco a saúde de pacientes, bem como dos próprios profissionais, além de ser mais um fator de risco em relação aos surtos por bactérias multirresistentes.

A Figura 37 mostra as espécies bacterianas identificadas em maior abundância nas amostras pertencentes aos PCC, enquanto que a Figura 38 mostra os genes de resistência identificados nesses PCC. Como pode-se observar, identificou-se nesses pontos uma alta abundância de espécies de bactérias Gram-negativas importantes no contexto das IRAS, por ambas as técnicas utilizadas, como *A. baumannii* complex, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. cloacae*. Como esperado, a abordagem NDC conseguiu recuperar uma maior quantidade de espécies diferentes. Porém, é possível observar que as espécies encontradas pela abordagem DC estão presentes nos achados das amostras NDC, mostrando mais uma vez uma boa correlação entre os diferentes métodos. Chama a atenção também a grande abundância de espécies de bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas na abordagem NDC. Pode-se constatar também, que nesses PCC havia a presença relevante de microrganismos resistentes, carregando genes que conferem resistência a classes importantes de antimicrobianos, como os genes *bla*_{KPC-like} e *bla*_{OXA-23-like}, que conferem resistência aos carbapenêmicos, principalmente em *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, respectivamente. As proporções mais altas de identificação de genes de resistência na abordagem NDC se dá, provavelmente, pelo número amostral maior testado, uma vez que o número de amostras classificadas como *hot spots* em NDC (para as quais os genes de resistência foram investigados) é proporcionalmente maior do que o número de BGN isolados de amostras DC.

Figura 38. Genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos identificados por PCR quantitativa (qPCR) nas amostras dependentes de cultivo (DC) e nas amostras não dependentes de cultivo (NDC) classificadas como pontos críticos de contaminação (PCC).



A Figura 39 mostra as frequências de genes de resistência codificantes de beta-lactamases identificadas nas amostras NDC, bem como a média do Cq para os genes positivos. É possível observar uma frequência maior de genes de resistência em amostras de pacientes, seguidos do ambiente e profissionais da saúde. As médias dos Cq apresentadas à direita do pontilhado não foram altas, demonstrando a boa recuperação da identificação de genes de resistência em amostras complexas (NDC) pela técnica de qPCR. Os genes mais frequentemente detectados foram *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{KPC-like} e *bla*_{SPM-like}, condizente com as espécies bacterianas de importância clínica mais detectadas nessas amostras.

Figura 39. Mapa de calor das frequências de genes de resistência codificadores de beta-lactamases identificadas em amostras não dependentes do cultivo (NDC) e suas respectivas médias dos ciclos de quantificação (Cq).

	Frequência				Média do Cq			
	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT
<i>bla</i> _{CTX-M-1 group}	23,7	4,3	0,0	9,0	23,5	29,5	0,0	25,0
<i>bla</i> _{CTX-M-2 group}	4,2	0,4	0,0	1,4	22,2	29,6	0,0	23,4
<i>bla</i> _{CTX-M-8 group}	7,7	7,3	5,9	7,2	25,7	26,8	27,6	26,5
<i>bla</i> _{CTX-M-9 group}	11,9	1,7	0,0	4,3	23,5	29,7	0,0	24,8
<i>bla</i> _{CTX-M-25 group}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>bla</i> _{KPC-like}	17,8	4,3	0,0	7,4	23,1	29,3	0,0	25,0
<i>bla</i> _{SHV-like}	39,0	12,4	2,9	18,3	25,1	29,8	28,0	26,9
<i>bla</i> _{SPM-like}	14,3	0,0	0,0	2,5	23,2	0,0	0,0	23,2
<i>bla</i> _{GES-like}	0,0	3,0	0,0	1,9	0,0	28,6	0,0	28,6
<i>bla</i> _{NDM-like}	0,0	0,9	0,0	0,5	0,0	29,2	0,0	29,2
<i>bla</i> _{IMP-like}	0,0	10,3	0,0	5,5	0,0	27,3	32,7	28,0
<i>bla</i> _{VIM-like}	0,0	0,9	0,0	0,5	0,0	24,7	0,0	24,7
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	71,4	19,6	20,9	28,1	20,8	27,6	25,8	24,5
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	67,9	16,8	14,0	24,2	24,7	28,6	28,2	26,8
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>bla</i> _{OXA-72-like}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	0,0	0,9	0,0	0,6	0,0	32,5	0,0	32,5

TT: total de amostras. PT: pacientes. PS: profissionais da saúde. AH: ambiente hospitalar. À esquerda: a cor vermelha indica frequências elevadas de genes de resistências, enquanto que as cores amarela e branca indicam baixa ou frequência nula, respectivamente. À direita: médias dos Cq para cada gene de resistência.

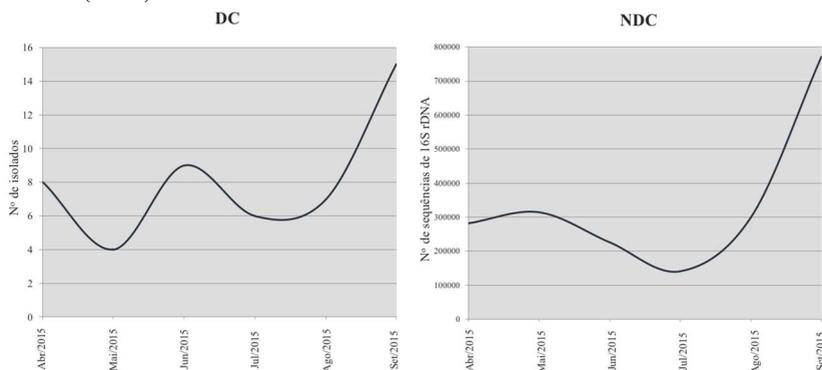
A Figura 40 foi construída para possibilitar a comparação dos dados de frequência de genes de resistência entre amostras DC e NDC. A Figura 40 mostra, em formato de mapa de calor, as frequências de genes identificados em amostras NDC. Para atender aos fins comparativos, foram escolhidas para compor esse mapa de calor as amostras NDC correspondentes às amostras DC, ou seja, não foram utilizadas as amostras NDC em sua totalidade. A Figura 1 do artigo apresentado no item 6.2 mostra esses mesmos dados para as amostras DC. É possível observar que houve a recuperação de um mesmo padrão, com maior resistência observada em *K. pneumoniae*, depois *E. cloacae* e *E. coli*, para as enterobactérias. Para *A. baumannii* destacou-se, mais uma vez, a alta frequência dos genes da família OXA, codificadores de carbapenamases, bem como do gene *bla*_{SPM-like} para *P. aeruginosa*. É possível observar também, que as frequências ficam mais altas para amostras de pacientes, seguidas de amostras do ambiente hospitalar e profissionais da saúde. O mapa de calor para as amostras NDC mostra, aparentemente, uma frequência maior e mais homogênea para alguns genes de resistência nos diferentes grupos bacterianos apresentados na figura. Porém, é importante salientar, que para fins comparativos, as amostras NDC, apesar de terem sido separadas nesses grupos, não apresentavam, necessariamente, apenas esse grupo de bactérias identificado, uma vez que são amostras de natureza complexa, com maior diversidade microbiológica. Assim, por exemplo, na coluna de *P. aeruginosa*, as frequências observadas para os genes *bla*_{KPC-like} e *bla*_{CTX-M-1 group} são provavelmente relativos às espécies de enterobactérias, presentes na mesma amostra NDC (que não passa por isolamento bacteriano) na qual foi identificada *P. aeruginosa*. Mesmo com diferença da natureza da amostra (amostra complexa versus isolado bacteriano), é possível observar que um perfil muito semelhante em relação à identificação de genes de resistência foi recuperado, o que corrobora, mas uma vez, a boa correlação entre as diferentes abordagens utilizadas. Além disso, fica evidente a vantagem em analisar amostras complexas, uma vez que a partir de uma única amostra pode-se obter as identificações dos genes de resistência alvos.

Figura 40. Mapa de calor das frequências de genes de resistência codificadores de beta-lactamases identificadas em amostras não dependentes do cultivo (NDC) correspondentes às amostras dependentes de cultivo (DC) que foram positivas para a presença de bacilos Gram-negativos (BGN).

	100% Frequência de genes de resistência 0%																															
	Enterobacteriaceae ^a												Acinetobacter spp. ^e								Pseudomonas spp. ^g											
	<i>K. pneumoniae</i> ^b				<i>E. cloacae</i> ^c				<i>E. coli</i> ^d				<i>A. baumannii</i> ^f				<i>P. aeruginosa</i> ^h															
	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT	PT	AH	PS	TT				
<i>bla</i> _{CTX-M-1} _{group}	50,0	10,3	0	27,3	35,0	12,0	0	20,4	20,8	0	0	19,3	26,0	8,1	0	17,7	15,4	3,4	0	6,3	15,4	3,1	0	5,9	42,1	0	0	32,0	42,1	0	0	23,5
<i>bla</i> _{CTX-M-2} _{group}	4,2	0	0	1,8	10	4,0	0	6,1	11,3	0	0	10,5	7,3	2,3	0	5,0	23,1	0	0	6,3	23,1	0	0	5,9	5,3	0	0	4,0	5,3	0	0	2,9
<i>bla</i> _{CTX-M-8} _{group}	30,4	41,4	0	35,2	10	32,0	0	20,4	5,8	33,3	0	7,1	10,8	32,6	0	18,9	0	17,2	0	10,4	0	15,6	0	9,8	21,1	0	0	16,0	21,1	0	0	11,8
<i>bla</i> _{CTX-M-9} _{group}	20,8	3,4	0	10,9	20	0	0	8,2	7,5	0	0	7,0	10,6	1,2	0	6,4	15,4	0	0	4,2	15,4	0	0	3,9	15,8	0	0	8,8	15,8	0	0	8,8
<i>bla</i> _{CTX-M-25} _{group}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>bla</i> _{KPC-like}	41,7	10,3	0	23,6	5,0	0	0	2,0	18,9	33,3	0	19,3	18,7	8,1	0	13,6	23,1	0	0	6,3	23,1	0	0	5,9	31,6	0	0	24,0	31,6	0	0	17,6
<i>bla</i> _{SHV-like}	87,5	51,7	0	65,5	30,0	36,0	25,0	32,7	62,3	33,3	0	59,6	54,5	41,9	9,1	47,3	23,1	27,6	0	23,1	25,0	0	0	21,6	78,9	0	0	60,0	78,9	0	44,1	
<i>bla</i> _{SPM-like}	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	15,8	0	0	12,0	21,1	0	0	11,8
<i>bla</i> _{GES-like}	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0

Outro dado comparativo muito interessante pode ser observado na Figura 41. Durante o período de vigilância do projeto, houve um surto de IRAS por *A. baumannii*, que iniciou no final do mês de agosto e permaneceu até meados do mês de setembro. As coletas de vigilância do projeto foram realizadas sempre no início de cada mês. Ao realizar a plotagem dos dados referentes ao isolamento dessa espécie bacteriana nas amostras DC e do número de sequências de 16S rDNA identificadas nas amostras NDC, para essa mesma espécie, é possível observar uma curva de crescimento acentuada no mês de setembro de 2015, em ambas as abordagens, mostrando claramente o aumento de *A. baumannii* na instituição e corroborando o estado de surto devido a essa espécie bacteriana.

Figura 41. Acompanhamento da identificação de *Acinetobacter baumannii* em amostras dependentes de cultivo (DC) e nas amostras não dependentes de cultivo (NDC).



À esquerda: número de isolados de *A. baumannii* identificados em amostras dependentes de cultivo (DC). À direita: número de sequências de 16S rRNA (V3/V4) correspondentes à *A. baumannii* identificadas em amostras não dependentes de cultivo (NDC). Em setembro de 2015 foi registrado no hospital um surto de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que teve como principal agente etiológico a bactéria *A. baumannii*.

A Figura 42 mostra o perfil genético de *A. baumannii* no mês de setembro para as amostras NDC. É possível visualizar que há dois genótipos de 16S rRNA V3/V4 correspondentes a *A. baumannii* dispersos em todas as amostras nas quais foram identificadas essa espécie bacteriana, no mês de setembro, mostrando sua ampla dispersão. É possível verificar também que, em algumas amostras em particular, foi identificada uma grande quantidade de sequências para *A.*

6.3.3 Análise das medidas de diversidade do microbioma hospitalar

Essa seção de resultados apresenta dados obtidos exclusivamente por meio da abordagem NDC.

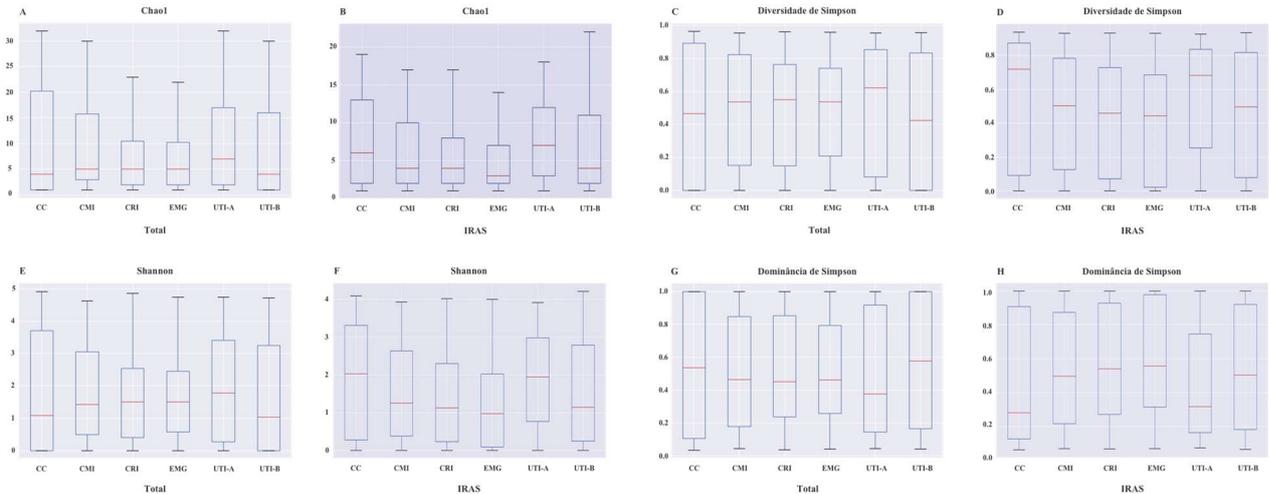
A diversidade pode ser definida, de forma simplificada, como o número de espécies presentes em um determinado nicho ecológico, ou seja, uma medida da riqueza de espécies. A abundância proporcional das espécies também é uma medida importante que auxilia na definição da diversidade (MORRIS *et al.* 2014). A alfa-diversidade e a beta-diversidade são termos cunhados por Whittaker em 1960 (WHITTAKER, 1960). A alfa-diversidade é uma medida sobre a riqueza de espécies em um determinado nicho ecológico – uma amostra ou conjunto de amostras, por exemplo –, enquanto que a beta-diversidade é uma medida que permite comparar a diversidade entre dois nichos ecológicos – entre amostras ou dois grupos de amostras diferentes (MORRIS *et al.* 2014; LOZUPONE *et al.*, 2007). Houve inúmeras tentativas de criar índices compostos que combinam medidas de riqueza e abundância. *Chao1*, por exemplo, é uma medida simples da riqueza de espécies. A diversidade de *Shannon* representa a incerteza sobre a identidade de um indivíduo desconhecido: em um sistema altamente diversificado e uniformemente distribuído, um indivíduo desconhecido pode pertencer a qualquer espécie, levando a uma alta incerteza nas previsões de sua identidade; já em um sistema menos diversificado dominado por uma ou poucas espécies, é mais fácil prever a identidade de indivíduos desconhecidos e há menos incerteza no sistema (MORRIS *et al.* 2014; SHANNON, 1948). O índice de diversidade de *Simpson* é o complemento do índice original de *Simpson* e representa a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente pertençam a diferentes espécies. O índice de dominância de *Simpson* está intimamente relacionado com o índice de diversidade de *Simpson*, sendo o inverso do índice original de *Simpson*. Ambas as transformações servem para aumentar o índice à medida que a diversidade aumenta e são sensíveis a espécies raras e abundantes (MORRIS *et al.* 2014). A beta-diversidade também pode ser medida de diversas maneiras: há medidas qualitativas, que utilizam a presença ou ausência de dados para comparar a composição da comunidade e medidas quantitativas, que levam em consideração a abundância relativa de cada tipo de organismo (LOZUPONE *et al.*, 2007). *Jaccard*, por exemplo, é uma medida qualitativa, enquanto *Bray Curtis* é uma medida quantitativa.

No presente trabalho, foram utilizados índices de alfa e beta-diversidade, que levam em consideração, nos seus cálculos, diferentes aspectos qualitativos e quantitativos de riqueza e abundância de espécies, de modo a acessar de forma mais precisa a diversidade de bactérias encontrada em pacientes, profissionais da saúde e no ambiente hospitalar. Os índices de alfa e beta-diversidade foram plotados em gráficos de acordo com critérios, como:

1. Fonte de coleta: pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar.
2. Sítios/locais de coleta: por exemplo, reto, mãos e narinas dos pacientes (sítios de coleta); equipamentos médico-hospitalares de uso comum e equipamentos médico hospitalares dos leitos dos pacientes (locais de coleta).
3. Unidades hospitalares: EMG, CRI, CC, CMI, UTI-A e B.
4. Meses de coleta: abril a setembro de 2015.

Na Figura 43 estão disponíveis os índices de alfa-diversidade *Chao1*, *Shannon*, Diversidade de *Simpson* e Dominância de *Simpson* segundo as unidades hospitalares, tanto para o total de bactérias detectadas no sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA, como também para as bactérias associadas às IRAS, ao nível de espécie. É possível observar uma semelhança das medianas dos índices de alfa-diversidade entre as diferentes unidades hospitalares. O CC, UTI-A, UTI-B apresentam uma tendência maior à variação da alfa-diversidade. A variabilidade intraespecífica das espécies é menor na EMG e CRI (especialmente para os gráficos presentes nas letras A, B, E e F da Figura 43). Os padrões se repetem para os diferentes índices de alfa-diversidade calculados, tanto para a observação do total de espécies de bactérias, como aquelas associadas às IRAS.

Figura 43. Índices de alfa-diversidade *Chao1*, *Shannon*, Diversidade de *Simpson* e Dominância de *Simpson* calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies de bactérias associadas às IRAS, separados de acordo com as diferentes unidades hospitalares.

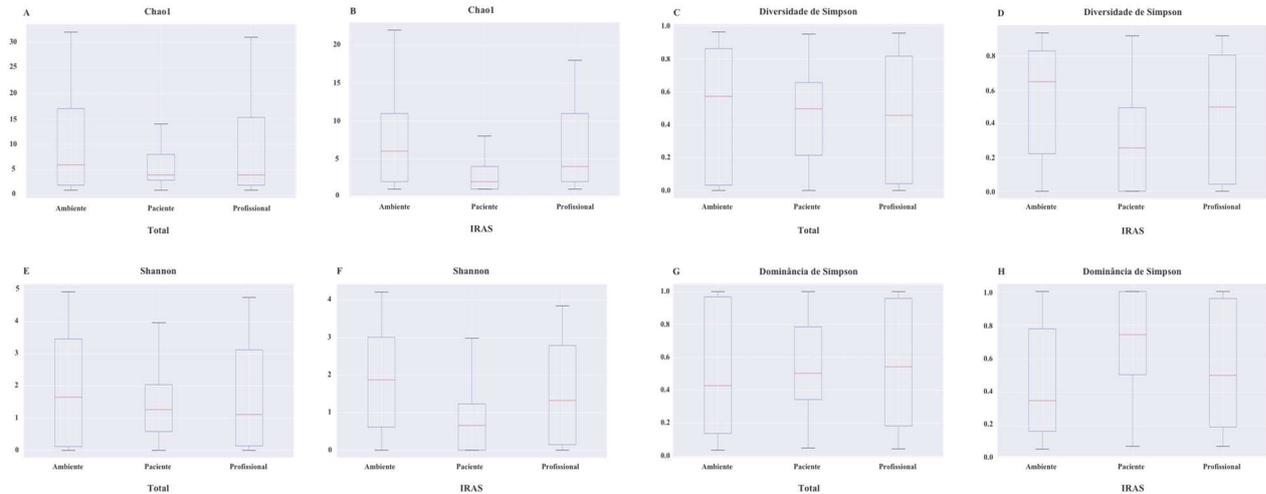


A e B: *Chao1* calculado para o total de espécies de bactérias e para aquelas pertencentes ao grupo IRAS. C e D: índice de diversidade de *Simpson* para o total de bactérias e para o grupo IRAS. E e F: índice de *Shannon* para o total de bactérias e grupo IRAS. G e H: índice de dominância de *Simpson* para o total de bactérias e grupo IRAS.

Os índices de alfa-diversidade segundo as fontes de coleta (Figura 44) mostram uma variabilidade menor nas amostras de pacientes. Especialmente para o filtro IRAS, os valores do índice alfa-diversidade tendem a ser maiores para o ambiente do que pacientes e profissionais da saúde. O índice de dominância de *Simpson* permite inferir que para os pacientes há maior prevalência de espécies dominantes. Essas observações se devem, possivelmente, aos sítios de coleta de pacientes com padrão de complexidade menor em relação à riqueza de espécies bacterianas, especialmente o *swab* retal de pacientes com infecção.

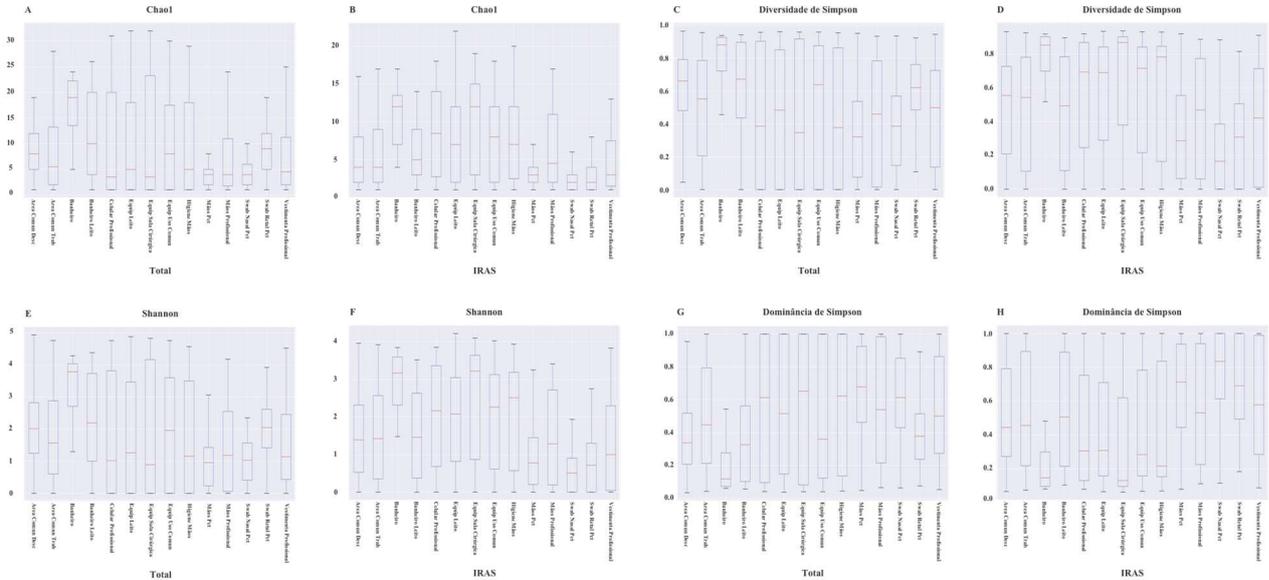
Essa informação pode ser observada também pela Figura 45: amostras de *swab* retal, das mãos e nasal de pacientes possuem uma variabilidade menor da alfa-diversidade do que a observada em amostras dos diversos ambientes. Nessa figura, destaca-se também os valores de alfa-diversidade (*Chao1*, *Shannon* e *Simpson*) encontrados no banheiro de uso comum, mais altos do que os demais ambientes e com perfil de menor dominância de espécies (dominância de *Simpson*). Já para os profissionais de saúde, os três sítios coletados apresentam uma mediana semelhante e alta variabilidade intra-específica.

Figura 44. Índices de alfa-diversidade *Chao1*, *Shannon*, Diversidade de *Simpson* e Dominância de *Simpson* calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies de bactérias associadas às IRAS, separados de acordo com as diferentes fontes de coleta.



A e B: *Chao1* calculado para o total de espécies de bactérias e para aquelas pertencentes ao grupo IRAS. C e D: índice de diversidade de *Simpson* para o total de bactérias e para o grupo IRAS. E e F: índice de *Shannon* para o total de bactérias e grupo IRAS. G e H: índice de dominância de *Simpson* para o total de bactérias e grupo IRAS.

Figura 45. Índices de alfa-diversidade *Chao1*, *Shannon*, Diversidade de *Simpson* e Dominância de *Simpson* calculados para o total de espécies de bactérias identificadas no microbioma hospitalar e para o grupo de espécies bacterianas associadas às IRAS, separados de acordo com os diferentes locais/sítios de coleta.



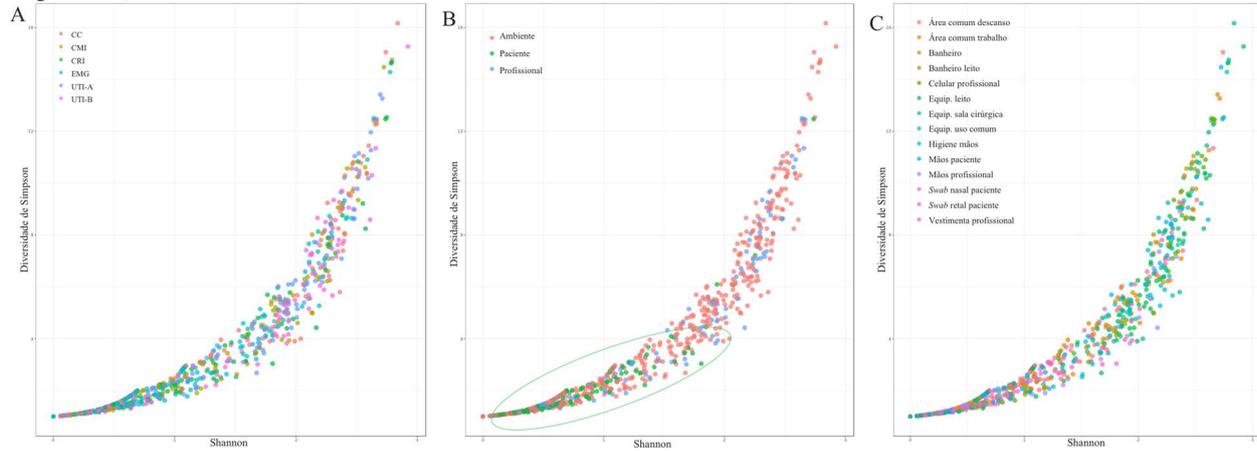
A e B: *Chao1* calculado para o total de espécies de bactérias e para aquelas pertencentes ao grupo IRAS. C e D: índice de diversidade de *Simpson* para o total de bactérias e para o grupo IRAS. E e F: índice de *Shannon* para o total de bactérias e grupo IRAS. G e H: índice de dominância de *Simpson* para o total de bactérias e grupo IRAS.

Na Figura 46 são apresentados gráficos com o índice de *Shannon* no eixo X e diversidade de *Simpson* no eixo Y, de forma que pudessem ser observados agrupamentos das amostras, segundo a alfa-diversidade. No entanto, é possível observar que não houve a formação de grupos distintos de amostras. Uma exceção pode ser visualizada na letra B da Figura 46 (elipse na cor verde), que mostra uma tendência de agrupamento das amostras de pacientes. Para as demais análises, por unidades hospitalares e local/sítio de coleta não houve a formação de agrupamentos.

Os gráficos gerados a partir dos índices de beta-diversidade (para as espécies de bactérias associadas às IRAS) segundo as unidades hospitalares, meses de coleta, fonte de coleta e locais/sítios de coleta estão disponíveis nas Figuras 47 a 50. As análises de beta-diversidade demonstram claramente que há ampla similaridade da diversidade de bactérias no hospital, tanto de forma temporal (ao longo dos meses – Figura 47), como espacialmente (entre unidades hospitalares – Figura 48 – e diferentes locais de coleta de amostras – Figuras 49 e 50), já que não há agrupamentos distintos para os diversos critérios de separação utilizados. A análise estatística, apesar de apresentar significância em alguns casos, demonstra baixa correlação entre as variáveis testadas. Novamente, a única exceção se apresenta para as análises de amostras de pacientes – na Figura 49 (elipse na cor verde) é possível observar uma tendência de agrupamento das amostras de pacientes, assim como na Figura 50, também demonstrada pelo aumento do R^2 .

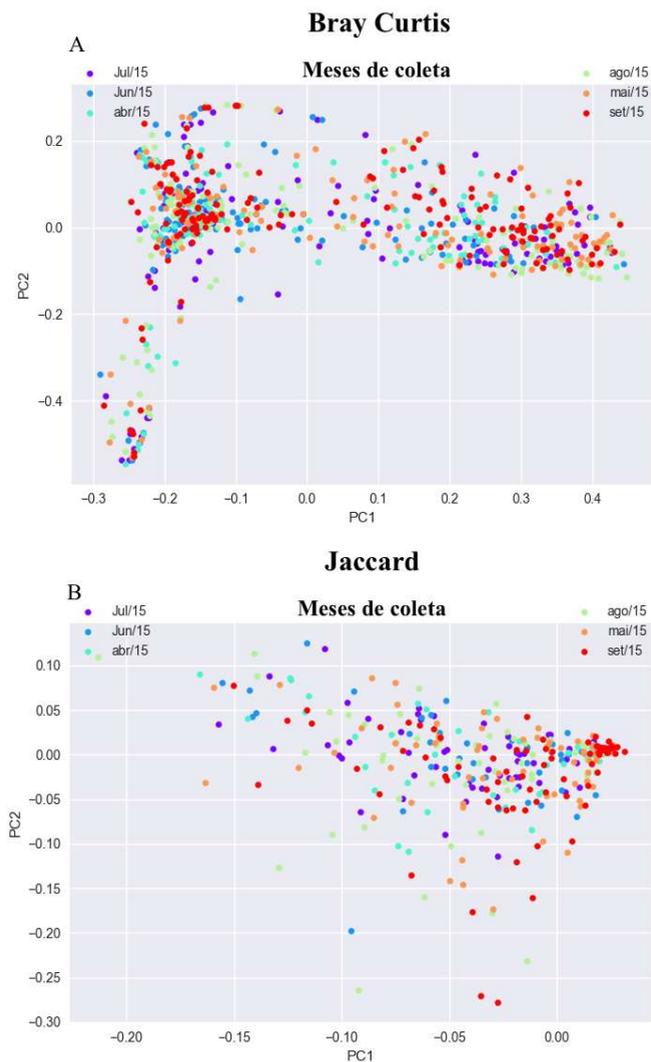
Esses dados sugerem uma ampla dispersão da comunidade de bactérias associadas às IRAS pelo hospital.

Figura 46. Índices de alfa-diversidade de *Shannon* versus Diversidade de *Simpson* de acordo com as diferentes unidades hospitalares, fontes de coleta e locais/sítios de coleta.



A: *Shannon* versus Diversidade de *Simpson* para as unidades hospitalares. B: *Shannon* versus Diversidade de *Simpson* para as fontes de coleta; elipse verde: tendência ao agrupamento de amostras de pacientes. C: *Shannon* versus Diversidade de *Simpson* para os locais/sítios de coleta.

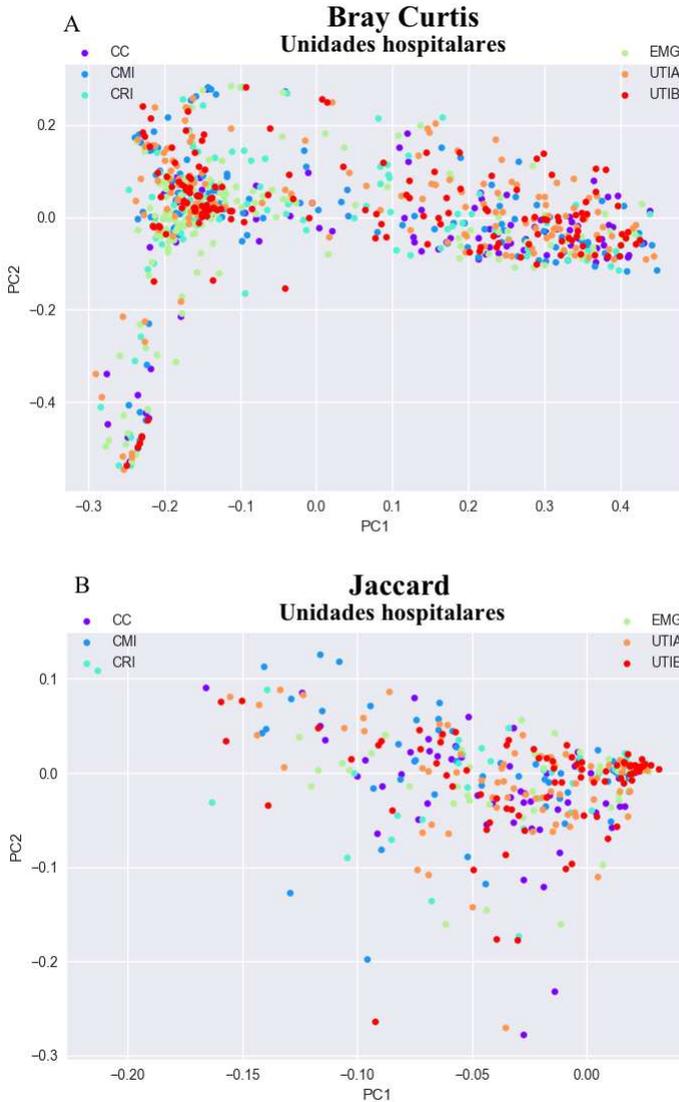
Figura 47. Índices de beta-diversidade *Bray Curtis* (A) e *Jaccard* (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com os meses de coleta.



Bray Curtis: PC1=9,4% e PC2=3,5% da variação; R^2 0,03 P=0,001.

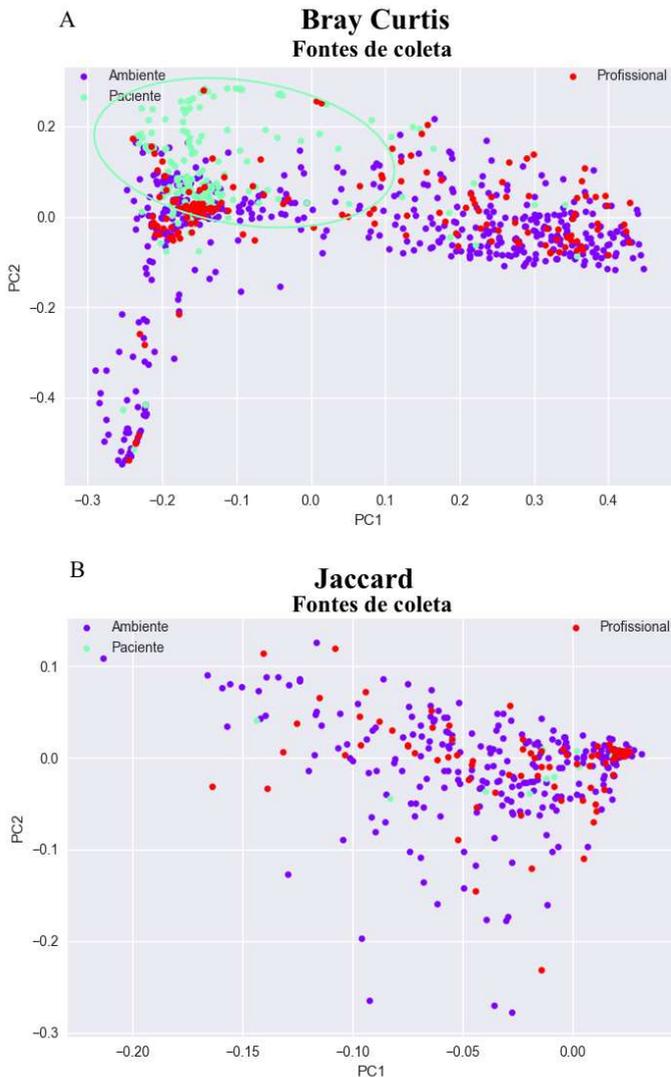
Jaccard: PC1=0,3% e PC2=0,2% da variação; R^2 0,001 P=0,003.

Figura 48. Índices de beta-diversidade *Bray Curtis* (A) e *Jaccard* (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com as unidades hospitalares.



Bray Curtis: PC1=9,4% e PC2=3,5% da variação; R^2 0,009 P=0,027.
Jaccard: PC1=0,3% e PC2=0,2% da variação; R^2 0,0007 P=0,031.

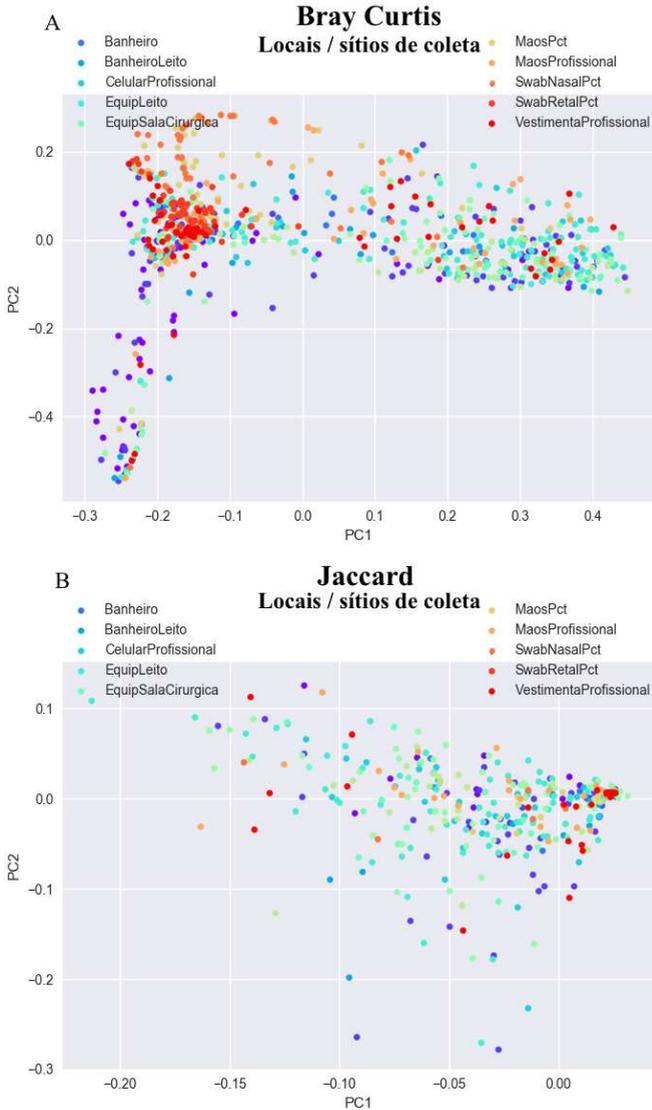
Figura 49. Índices de beta-diversidade *Bray Curtis* (A) e *Jaccard* (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com as diferentes fontes de coleta.



Bray Curtis: PC1=9,4% e PC2=3,5% da variação; R^2 0,14 P=0,001. Elipse verde: tendência ao agrupamento de amostras de pacientes.

Jaccard: PC1=0,3% e PC2=0,2% da variação; R^2 0,005 P=0,001.

Figura 50. Índices de beta-diversidade *Bray Curtis* (A) e *Jaccard* (B) para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma hospitalar, separados de acordo com os diferentes locais/sítios de coleta.



Bray Curtis: PC1=9,4% e PC2=3,5% da variação; R^2 0,13 P=0,001.

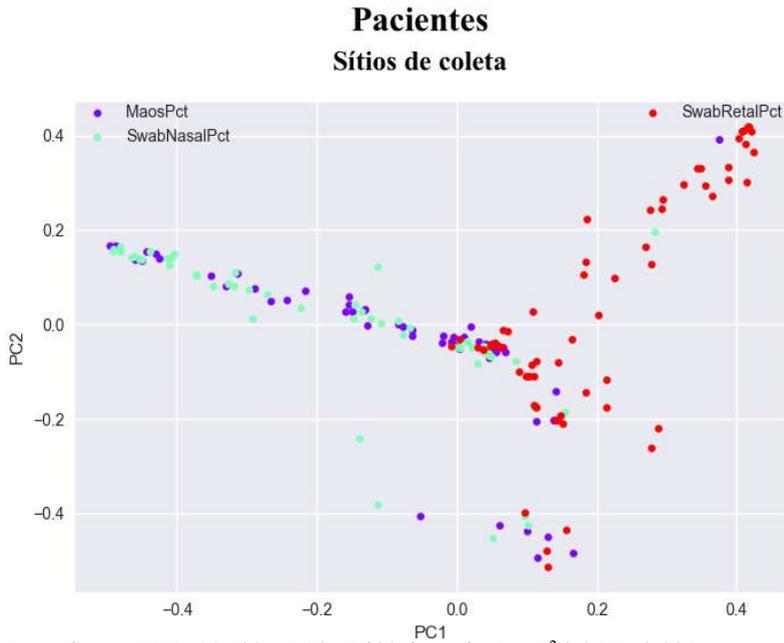
Jaccard: PC1=0,3% e PC2=0,2% da variação; R^2 0,003 P=0,001.

Nas Figuras 51 a 53 a tendência de separação do grupo de pacientes pode ser visualizada mais claramente; a correlação (R^2) aumentou consideravelmente em relação às análises anteriores. Esses gráficos foram gerados a partir das análises de beta-diversidade para três grupos de amostras em separado:

- a) amostras de pacientes (Figura 51);
- b) amostras de pacientes e seus respectivos leitos de internação (Figura 52);
- c) amostras de pacientes e de profissionais da saúde (Figura 53).

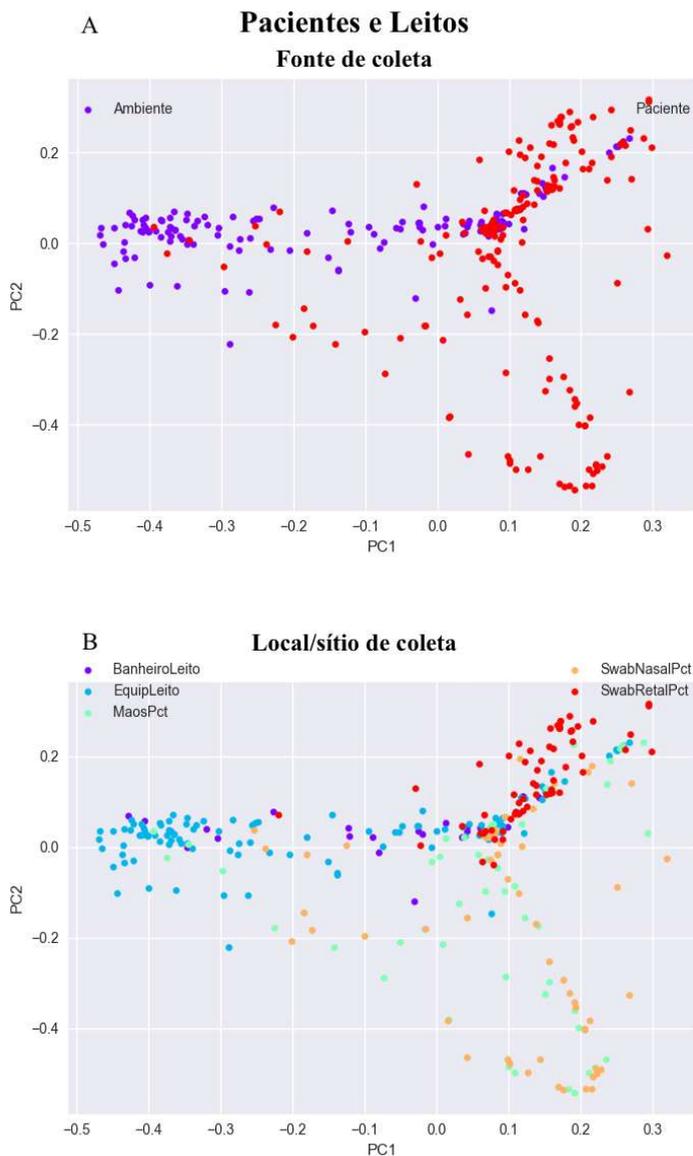
Nas análises desses grupos de amostras pode-se observar uma separação maior em relação aos sítios de coleta; nas amostras de pacientes (Figura 51), por exemplo, há maior similaridade de espécies entre amostras das mãos e das narinas, que se diferenciam das amostras de *swab* retal. As amostras de profissionais da saúde e pacientes possuem uma tendência à separação (Figura 53 A), no entanto, há algumas amostras que mostram maior similaridade, como as amostras da vestimenta e *swab* retal (Figura 53 B), ou seja, é possível observar a similaridade de espécies entre amostras aparentemente muito distintas. Na Figura 53 também é possível visualizar que as amostras de mãos de profissionais e seus telefones celulares mostram maior proximidade e, em menor grau, com as amostras das vestimentas. As amostras de equipamentos de leito, apesar de também apresentarem uma tendência ao agrupamento, ainda mostram similaridade considerável com as amostras dos pacientes (Figura 52).

Figura 51. Índices de beta-diversidade *Bray Curtis* para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma dos pacientes, de acordo com os diferentes sítios de coleta.



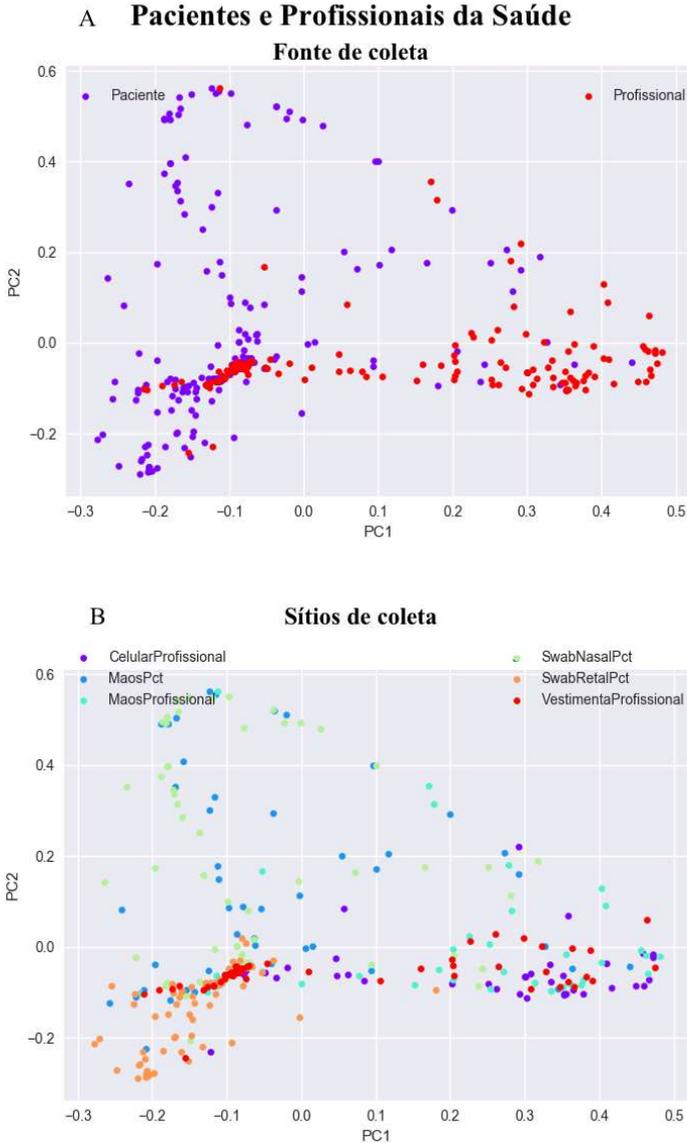
Bray Curtis: PC1=11,7% e PC2=7,8% da variação; R^2 0,25 P=0,001.

Figura 52. Índice de beta-diversidade de *Bray Curtis* para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma de pacientes e seus respectivos leitos de internação, separados de acordo com as diferentes fontes (A) e locais/sítios de coleta (B).



Bray Curtis: PC1=8,8% e PC2=6,5% da variação; R^2 0,22 P=0,001.

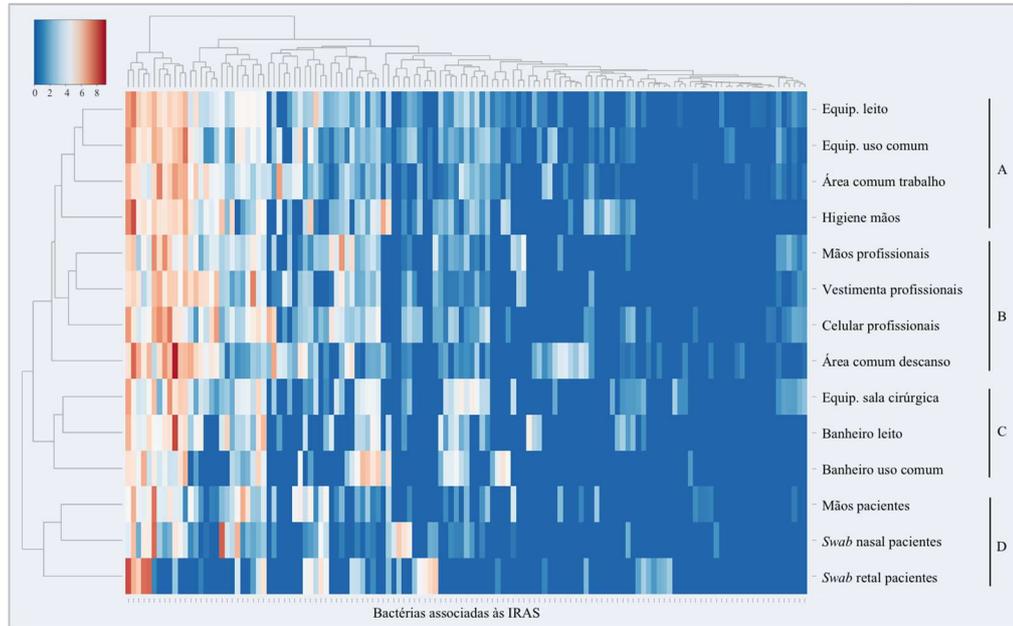
Figura 53. Índice de beta-diversidade de *Bray Curtis* para as espécies de bactérias associadas às IRAS identificadas no microbioma de pacientes e profissionais da saúde, separados de acordo com as diferentes fontes (A) e sítios de coleta (B).



Para a Figura 54, foi construído um *heatmap* que permitiu separar as amostras em quatro grupos, segundo dendograma das bactérias associadas às IRAS mais abundantes (horizontal) nas amostras dos diferentes locais/sítios de coleta (vertical):

1. Grupo A: equipamentos de leito, equipamentos de uso comum, áreas comuns de trabalho dos profissionais e equipamentos de higiene de mãos. É possível notar que esse agrupamento é formado por locais de coleta muito manipulados pelos profissionais da saúde.
2. Grupo B: mãos, telefone celular e vestimenta dos profissionais da saúde e áreas comuns de descanso dos profissionais. Ao observar as espécies associadas às IRAS mais frequentemente identificadas, as amostras dos profissionais da saúde parecem ter uma similaridade maior com a copa e quartos de repouso, utilizados por esses profissionais, do que seus ambientes de trabalho.
3. Grupo C: mãos, narinas e reto de pacientes.
4. Grupo D: banheiros dos leitos dos pacientes, banheiros de uso comum e equipamentos da sala cirúrgica. As amostras do centro cirúrgico são habitualmente mais distintas, porém nessa configuração, se aproximou mais das amostras dos banheiros.

Figura 54. Agrupamento de amostras em *heatmap* segundo as bactérias associadas às IRAS mais abundantes nos diferentes locais/sítios de coleta.

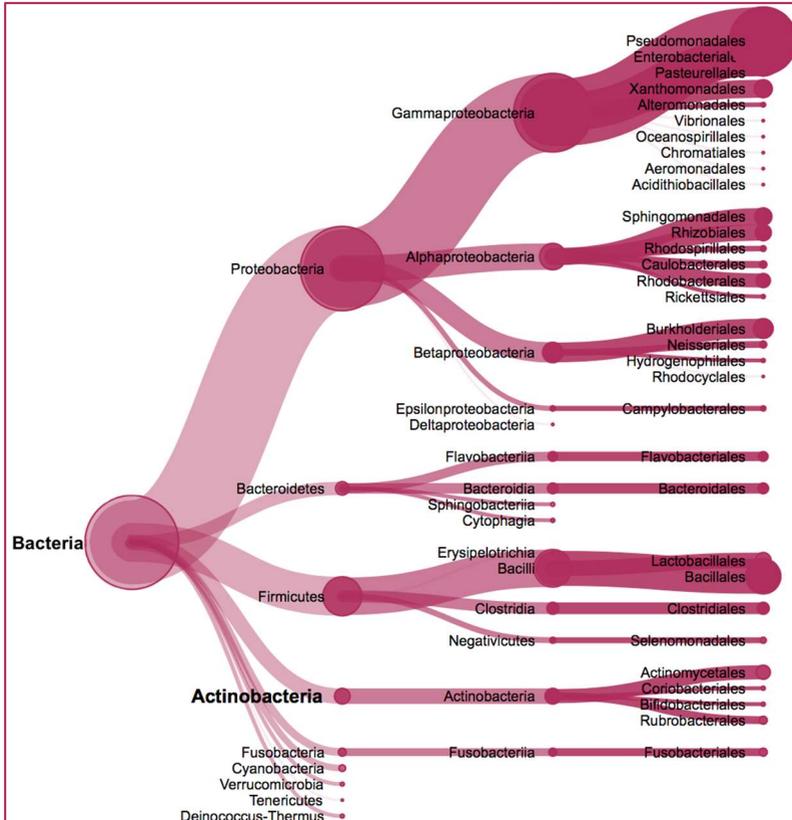


Na horizontal estão representadas as espécies de bactérias associadas às IRAS – as bactérias mais abundantes são mostradas em vermelho, enquanto as menos abundantes em azul. Na vertical são mostrados os diferentes locais/sítios de coleta. As letras A, B, C e D representam quatro grandes agrupamentos formados de acordo o dendograma de similaridade entre os locais/sítios de coleta segundo as bactérias associadas as IRAS identificadas em maior abundância.

Nas Figuras 55 a 57 estão disponíveis os filios, classes, ordens e famílias mais abundantes em relação a todas as bactérias identificadas no microbioma hospitalar, de acordo com a fonte de coleta. É possível observar a semelhança dos perfis entre as amostras do ambiente, profissionais da saúde e pacientes. Destaca-se, em todos os perfis, o filo Proteobacteria, como o mais abundante em todas as fontes de coleta. Esse filo abriga inúmeras espécies de relevância clínica, como a família Enterobacteriaceae e os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. A partir dessas figuras, pode-se observar que as bactérias mais abundantes no microbioma hospitalar são aquelas associadas às IRAS ou potencialmente patogênicas – de fato, pelo menos 50% do total de bactérias identificadas dos diversos locais de coleta pertencem ao grupo de bactérias associadas às IRAS.

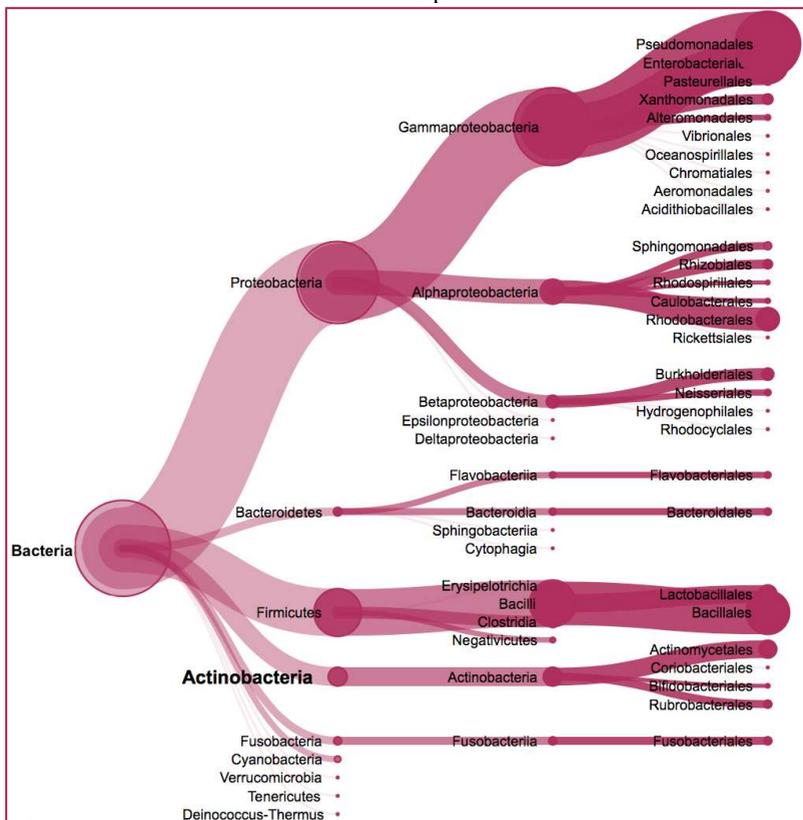
A Figura 58 mostra os perfis das espécies de bactérias encontradas em maior abundância no microbioma hospitalar para o grupo de bactérias associadas às IRAS. Nesses perfis, destacam-se *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, responsáveis pela ampla maioria dos casos de IRAS no hospital. É possível observar, mais uma vez, a semelhança dos perfis microbiológicos encontrados em pacientes, profissionais da saúde e o ambiente hospitalar, também não distintos entre as diferentes unidades hospitalares e locais específicos de coleta. Ao se comparar a lista das espécies mais abundantes associadas às IRAS com a lista de todas as espécies mais abundantes identificadas no microbioma hospitalar (dados não mostrados), somente duas espécies bacterianas não são concomitantes, ou seja, independentemente da utilização do filtro IRAS, é possível observar um mesmo perfil das espécies mais abundantes, comprovando, mais uma vez, a ampla dispersão de espécies com potencial patogênico e clinicamente relevantes no contexto das IRAS no ambiente hospitalar, profissionais da saúde e pacientes.

Figura 55. Árvore da abundância dos filos, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma do ambiente hospitalar.



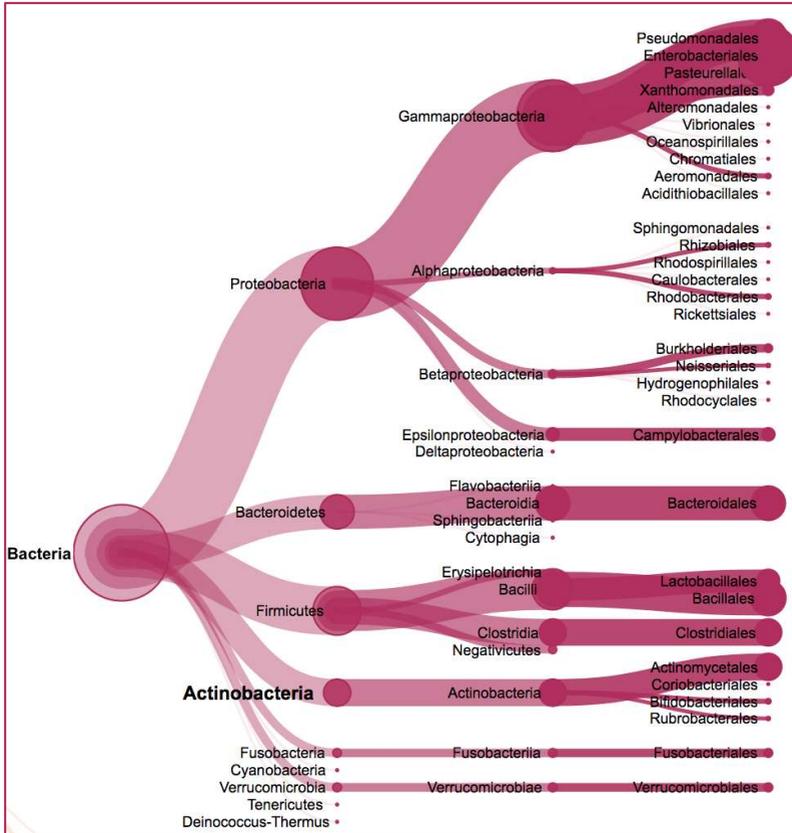
Os ramos de maior espessura representam aqueles filos, classes, ordens ou famílias de bactérias encontrados em maior abundância.

Figura 56. Árvore da abundância dos filios, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma dos profissionais da saúde.



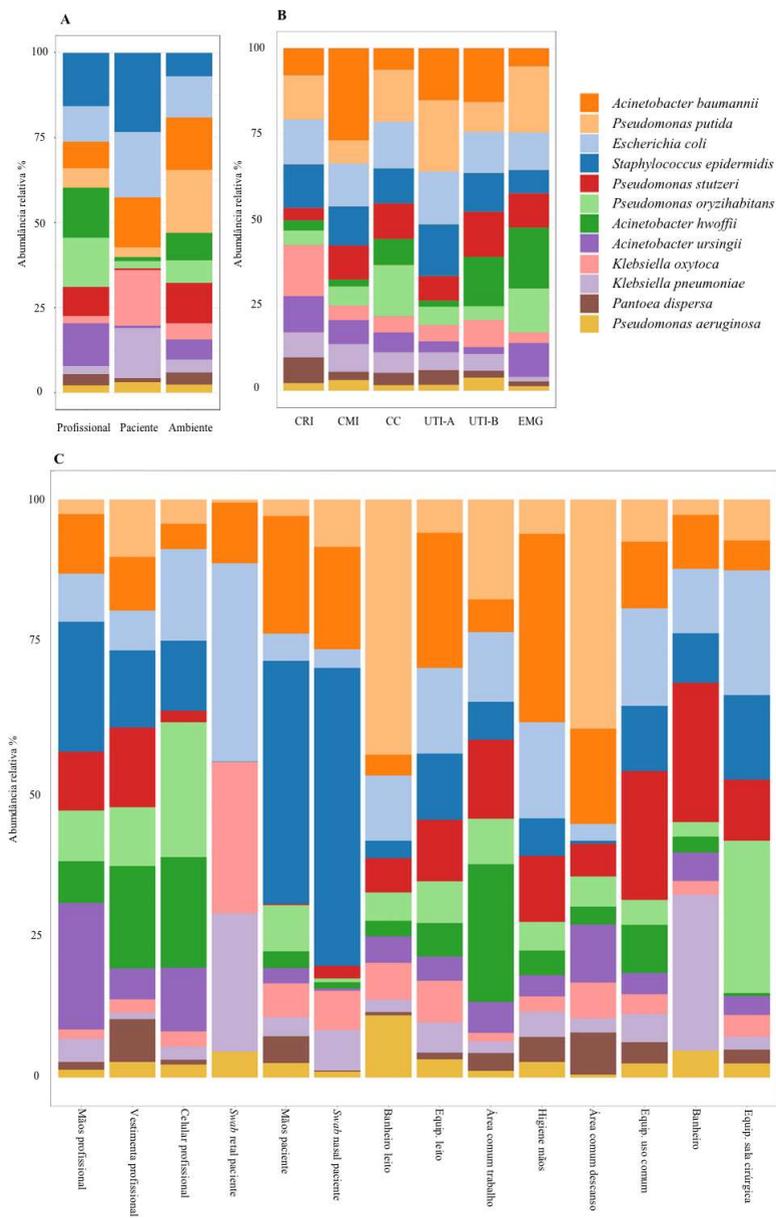
Os ramos de maior espessura representam aqueles filios, classes, ordens ou famílias de bactérias encontrados em maior abundância.

Figura 57. Árvore da abundância dos filos, classes, ordens e famílias de bactérias identificadas no microbioma dos pacientes.



Os ramos de maior espessura representam aqueles filos, classes, ordens ou famílias de bactérias encontrados em maior abundância.

Figura 58. Abundância relativa das espécies de bactérias associadas às IRAS mais prevalentes, de acordo com a fonte de coleta (A), unidades hospitalares (B) e local/sítio de coleta (C).



7 DISCUSSÃO

Em países em desenvolvimento, o risco de adquirir uma infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) é alto, chegando a 27%. A luta para melhorar a segurança do paciente é difícil, devido às taxas crescentes de resistência aos antimicrobianos, acoplado a problemas dos sistemas de saúde e ao fato de as autoridades de saúde não estarem suficientemente preparadas para lidar com a problemática (PITTET *et al.*, 2008; RAZA *et al.*, 2004). Há diversas evidências de que o ambiente tem um papel importante na transmissão das IRAS (OTTER *et al.*, 2013a; WEBER *et al.*, 2013; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011). As bactérias Gram-negativas são de especial importância, devido à sua prevalência, sendo uma das principais causas de IRAS, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, e por apresentarem uma boa performance contra os antimicrobianos, o que causa grande preocupação sobre as terapias disponíveis (PELEG; HOOPER, 2010). Nesse contexto, o Brasil tem grandes desafios na detecção e controle da resistência aos antimicrobianos, uma vez que os sistemas de vigilância são ineficientes, especialmente nas regiões sul e sudeste, onde esse problema parece ser mais relevante, devido à concentração de serviços de saúde (ROSSI, *et al.*, 2011).

O presente trabalho, testou a hipótese de que métodos moleculares genotípicos de rastreamento e identificação são mais efetivos para determinação da etiologia e caracterização da resistência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) de origem bacteriana, constituindo-se em importantes aliados no manejo de tais infecções. Para isso e, cumprindo com os objetivos específicos, os resultados foram apresentados em três seções, que serão discutidos a seguir.

Com o intuito de comparar métodos de identificação genotípicos e fenotípicos e as abordagens dependentes de cultivo (DC) e não dependentes do cultivo celular (NDC), na primeira seção de resultados, um grupo de amostras contendo as espécies de bacilos Gram-negativos associados comumente às IRAS e, portanto, de interesse clínico, foi escolhido para verificação dos níveis de concordância utilizando o índice Kappa.

Com exceção de *E. cloacae* complex, as demais espécies e gêneros bacterianos analisados (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) mostraram excelente concordância comparando-se as diferentes técnicas de identificação na abordagem DC.

Em dissertação de mestrado realizada por pesquisadora do projeto HAIMP (CUNHA, 2017), que teve como objetivo identificar e caracterizar, por meio de técnicas fenotípicas e genotípicas, 284 isolados da família Enterobacteriaceae obtidos no decorrer do projeto, também foram encontradas excelentes concordâncias ao nível de gênero e de espécie (Kappa de 0,828 e 0,908 respectivamente) entre os métodos de identificação microbiológica Vitek2[®] e sequenciamento do gene 16S rRNA.

No presente trabalho, a análise das discordâncias encontradas para comparação de diferentes métodos de identificação testados em amostras DC permitem observar principalmente dificuldades na identificação de *E. cloacae*. Cunha (2017) demonstrou que a menor concordância ao nível de gênero, apesar de excelente, não foi mais alta devido às discordâncias entre *Enterobacter* e *Klebsiella*. De forma semelhante, os métodos Vitek2[®] e sequenciamento do gene 16S rRNA região V3/V4 não permitiram a identificação inequívoca de isolados de *Pantoea* spp. ao nível de espécie. Em sua pesquisa, Cunha (2017) buscou encontrar a melhor hipótese para explicar as discordâncias encontradas e para isso as distâncias de nucleotídeos entre as sequências identificadas (*pairwise distance*) foram calculadas, além da adoção da classificação baseada em LCA (em inglês, *Least Common Ancestor*). No gênero *Pantoea* spp. concluiu-se que o fragmento analisado não possui poder discriminatório para a classificação ao nível de espécie, já que as variações intra e interespecíficas foram similares. Para *E. cloacae* complex, a hipótese levantada e mais provável para a identificação ambígua com *Klebsiella oxytoca* também foi que o fragmento do gene 16S rRNA analisado não possui poder discriminatório suficiente, sugerindo 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 (CUNHA, 2017). A fim de sanar as discordâncias será necessária a aplicação de outras técnicas de identificação, como sequenciamento completo do genoma.

No presente trabalho, a segunda maior discordância encontrada foi para a identificação de *Acinetobacter* ao nível de espécie. Resultados apresentados na seção 6.2 mostram que alguns isolados bacterianos identificados pelo sistema Vitek2[®] como *A. baumannii* complex foram negativos para o gene *bla*_{OXA-51-like}, comumente presente em espécies desse complexo. Esses isolados são aqueles identificados pelo sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA como não pertencentes ao complexo *A. baumannii* – *A. soli* e *A. radioresistens* –

corroborando que, possivelmente, para esses casos discordantes, houve identificação equivocada pelo sistema Vitek2[®]. Lee e colaboradores (2014) compararam a acurácia da identificação de espécies do gênero *Acinetobacter* utilizando quatro métodos de identificação, fenotípicos e genotípicos, dentre eles o sistema Vitek2[®] e o sequenciamento do gene 16S rRNA, além de sequenciamento do gene rpoB e PCR multiplex do marcador gyrB. Os autores encontraram uma acurácia de 93,4% para a identificação por sequenciamento do 16S rRNA e de apenas 35,9% para o sistema Vitek2[®]. Dos 167 isolados utilizados para comparar os métodos de identificação neste estudo, o sistema Vitek2[®] identificou 130 isolados como *A. baumannii*. No entanto, apenas 52 (40%) destes foram realmente confirmados como *A. baumannii*, sendo que os isolados restantes eram pertencentes a outras espécies do complexo Abc ou espécies não-Abc. Dos 38 isolados não-Abc, apenas oito foram identificadas corretamente, sendo os outros 28 isolados identificadas incorretamente pelo sistema Vitek2[®]. Segundo os autores os resultados apresentados devem ser interpretados como uma limitação do teste fenotípico e não necessariamente da falta de confiabilidade dos resultados da identificação pelo sistema Vitek2[®]. Os autores concluíram que tanto o sequenciamento do gene 16S rRNA 16S como do gene rpoB podem ser úteis na identificação de *Acinetobacter* (LEE *et al.*, 2014).

Para as demais espécies pesquisadas, as discordâncias para identificação entre os diferentes métodos na abordagem DC foram raras ou inexistentes (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*).

Comparando-se os diferentes métodos de identificação (fenotípico e genotípico) nas abordagens DC e NDC analisadas, novamente, com exceção de *E. cloacae* complex, o índice Kappa para as demais espécies (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) demonstrou boa concordância entre os métodos. Para as discordâncias reportadas nesse grupo de bactérias, foi possível identificar que as mesmas se deram pela composição microbiológica com padrões considerados complexos em amostras ambientais NDC, com presença de maior número de espécies bacterianas não habitualmente cultivadas.

Estudo realizado por Srinivasan e colaboradores (2015) utilizou um repositório de 617 isolados clínicos, com representantes de 30 espécies clinicamente importantes para avaliar a capacidade do sequenciamento do gene 16S na identificação bacteriana ao nível de espécie, utilizando para isso técnicas de *machine learning*, um algoritmo de classificação (Naive Bayes) e um conjunto diversificado de seqüências de alta qualidade de bactérias de importância médica. Os resultados mostraram uma taxa de concordância ao nível do gênero de

96,0% e de 87,5% ao nível de espécie. Foram apontados diversos casos de identificação equivocada por métodos tradicionais baseados em cultivo, mas também limitações da identificação por 16S rRNA, em particular para espécies da família Enterobacteriaceae, provavelmente devido a uma combinação de imprecisões na base de dados e a própria variabilidade biológica, limitando o poder do gene 16S rRNA (SRINIVASAN *et al.*, 2015). Os resultados demonstraram uma alta confiabilidade do 16S rRNA para a identificação ao nível de gênero e um bom nível de confiabilidade para o nível de espécie, com exceções em certos gêneros, como *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia*. Segundo os autores, as dificuldades de identificação ao nível de espécie são devidas, provavelmente, a ambiguidades taxonômicas, sugerindo falta de poder discriminatório desse marcador. Srinivasan e colaboradores (2015) ressaltam que os debates taxonômicos das ambiguidades continuarão, necessariamente, e provavelmente evoluirão à medida que surjam mais dados de identificação bacteriana baseados em sequenciamento, porém é certo que o sequenciamento de marcadores baseados em genes bacterianos continuarão sendo uma medida válida e não subjetiva (em comparação com as técnicas de cultivo e os ensaios bioquímicos) de identificação bacteriana, embora, alguns marcadores particulares possam proporcionar um poder discriminatório fraco para grupos específicos de microrganismos.

Há mais de uma década pesquisadores encontraram problemas de resolução ao nível de gênero e/ou espécie para identificação bacteriana utilizando o 16S rRNA, incluindo principalmente (não exclusivamente) a família Enterobacteriaceae (em particular *Enterobacter* e *Pantoea*), micobactérias de crescimento rápido, *Acinetobacter baumannii* complex, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* e *Actinomyces* (JANDA; ABBOTT, 2007). No entanto, várias características do gene 16S rRNA o tornam uma ferramenta filogenética importante e, portanto, útil para a identificação microbiológica clínica: este gene está presente em todas as espécies de bactérias (é um alvo universal para a identificação bacteriana); a funcionalidade do 16S rRNA permaneceu constante ao longo da evolução e mudanças na sequência refletem mudanças aleatórias e não mudanças selecionadas que alteram a função da molécula; mudanças aleatórias são uma medida mais acurada do tempo (evolução); o gene é suficientemente grande (aproximadamente 1.500 pb) e a molécula consiste em aproximadamente 50 domínios funcionais, contendo informações estatisticamente relevantes para os propósitos de bioinformática. Além disso, uma questão importante a ser avaliada diz respeito à quão precisa é a identificação de espécies utilizando

metodologias convencionais ou sistemas comerciais na rotina clínica (JANDA; ABBOTT, 2007; PATEL, 2001).

Em resultado apresentado no item 6.3 foi possível observar um padrão de maior detecção de bactérias associadas às IRAS com perfis de resistência aos antimicrobianos por meio do método NDC em comparação ao DC, na CMI. Foram citados diversos exemplos sobre a recuperação de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* e de genes de resistência em amostras NDC, não recuperados para as amostras DC. Também foi apresentado dado sobre o evento de surto por *A. baumannii* no mês de setembro, identificado nos resultados do presente trabalho pelo aumento de isolados (DC) e também pelo aumento significativo de sequências de 16S rDNA (NDC) referente a essa espécie bacteriana na coleta do mês de setembro. As análises NDC permitiram também demonstrar que o mesmo perfil genético das sequências de 16S rDNA referentes a *A. baumannii*, para diversas amostras coletadas. Assim, os resultados apresentados trazem à tona a possibilidade de se realizar rastreamento e identificação de bactérias relevantes no contexto das IRAS com abordagens que permitem o ganho de escalabilidade, de tempo e a redução do custo de análise, sem que se perca a qualidade e recuperação da informação biológica daquelas espécies clinicamente mais relevantes. Além disso, novos métodos de rastreamento, por exemplo, que utilizam como base a metagenômica, podem recuperar uma quantidade de informações muito maior, uma vez que sua metodologia e banco de dados não se limitam às espécies cultiváveis.

Na segunda e terceira seções de resultados foram apresentados os dados relativos à identificação microbiológica e resistência bacteriana em amostras DC e NDC, dados recolhidos a partir dos questionários e o perfil do microbioma hospitalar e sua relação com as IRAS.

Foi possível observar que os critérios de inclusão utilizados para os pacientes permitiram a identificação de perfis de pacientes de longa estadia, que possuem riscos acumulados para aquisição de IRAS (WHO, 2011). Dentre os maiores riscos para esse grupo de pacientes, além do tempo de internação prolongado, foi identificada a internação em mais de uma unidade hospitalar, a realização de cirurgia durante a internação, uso de dispositivo invasivo e internações recorrentes. Esses fatores de risco, colaboraram para a alta taxa de IRAS (45,5%), colonização por microrganismos multirresistentes (63,6%) e uso de antimicrobianos (72,7%) encontrados no grupo de pacientes do presente estudo.

É notável também o risco de exposição dos profissionais da saúde aos microrganismos associados às IRAS, uma vez que em 30,5% do grupo que participou do estudo apresentou resultados positivos para o

isolamento de BGN, com detecção de multirresistência em alguns casos. Os dados coletados a partir dos questionários são de especial importância, pois apontam possíveis intervenções que poderão ser realizadas junto à equipe de profissionais da saúde, sobre a necessidade de realizar programas de capacitação e reciclagem profissional e o estudo de práticas que possam promover a maior comunicação sobre informações importantes a serem fornecidas e divulgadas pela CCIH em relação ao controle de IRAS. Por exemplo: a uniformização dos procedimentos de higienização e desinfecção dos itens dos leitos pelos profissionais da saúde nas diferentes unidades, divulgação sistemática dos indicadores de IRAS das unidades e adoção de harmonização da capacitação para as diferentes classes de profissionais da saúde, de forma que não haja discrepâncias das condutas entre as diversas profissões que compõe o corpo clínico do hospital.

Os mapas de risco gerados para as unidades hospitalares incluídas no presente estudo a partir do sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA permitiram a identificação de pontos de contaminação recorrentes por bactérias associadas às IRAS. Algumas das áreas com maiores contaminações são classicamente reportadas pela literatura como críticas, como o entorno do paciente – o seu leito, principalmente. Também por meio do sequenciamento do 16S rRNA, Lax e colaboradores (2017) demonstraram uma forte interação entre a pele dos pacientes e seus leitos e Hewitt e colaboradores (2013) demonstraram a interação entre a microbiota humana e as contaminações encontradas em incubadoras de pacientes neonatos. Gaudart e colaboradores (2013) demonstraram a contaminação significativa de diversos itens dos leitos de pacientes como as grades da cama, a mesa de cabeceira, o carro de armazenamento de materiais e o dispensador de álcool em gel, por exemplo.

No entanto, o presente estudo incluiu, além das áreas adjacentes aos pacientes, áreas de trabalho e descanso dos profissionais da saúde. Os resultados obtidos permitiram demonstrar que essas áreas apresentam contaminações tão relevantes quanto aquelas encontradas no ambiente do entorno do paciente. Os resultados apresentados, tanto para amostras DC como NDC, permitiram que fossem identificados pontos críticos de contaminação (PCC), sendo que os mais inesperados e preocupantes foram encontrados nas áreas de descanso dos profissionais da saúde, como a Copa e as Salas de repouso, que ficaram apenas atrás dos *swabs* retais em número de isolados de BGN, com resultados positivos para BGN MDR. As áreas comuns de trabalho dos profissionais da saúde e equipamentos médicos-hospitalares de uso comum também foram

identificadas como pontos críticos de contaminação, muitos deles contaminados com BGN resistentes aos carbapenêmicos. As espécies de bactérias mais frequentemente identificadas nos PCC, tanto pela abordagem DC como NDC, são patogênicas, clinicamente relevantes e reportadas como causadoras de grande parcela dos casos de IRAS no Brasil, como *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. Além disso, nos PCC foram encontrados genes que conferem resistência aos carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro em frequências consideráveis. Esses achados podem ser explicados por possível negligência, em relação ao uso inadequado e falhas de higienização dessas áreas, especialmente aquelas destinadas aos intervalos de descanso dos profissionais da saúde. É importante ressaltar que todas as ações que permitam diminuir o risco de disseminação de bactérias potencialmente patogênicas são ações no sentido de garantir a segurança do paciente. Ou seja, as boas práticas de uso de todas as áreas que compõe as instituições de saúde, as boas práticas de higienização das mãos aplicadas a todos os locais, o uso racional de vestimentas exclusivas às unidades hospitalares e as boas práticas de cuidado ao paciente, somente quando realizadas de forma linear e conjunta, poderão contar positivamente para a garantia da segurança do paciente.

Do total de amostras coletadas, foi possível observar que as amostras de pacientes (PT), profissionais da saúde (PS) e do ambiente e equipamentos hospitalares (AH) apresentaram frequências diferentes de BGN isolados. Houve uma taxa de colonização maior em PT e AH do que para os PS. Ao se observar os *hot spots* de contaminação por bactérias associadas às IRAS, também foi possível observar uma prevalência maior em PT do que em AH e PS. Em relação aos profissionais de saúde, foram isolados e classificados como *hotspots*, em maior frequência, amostras das vestimentas e mãos. Esse resultado é um alerta para as questões relativas às vestimentas dos profissionais. Habitualmente se dá muita atenção à importância da higienização frequente de mãos e mais recentemente dos celulares, além de serem constantes os alertas relativos ao uso de jalecos pelos profissionais da saúde em áreas inadequadas, dentro e fora da instituição. A vestimenta mais utilizada durante o período do rastreamento foram roupas exclusivas da unidade, fornecidas pelo próprio hospital, e não jalecos, que são de propriedade individual. Abre-se assim, a necessidade de uma discussão ampliada, por exemplo, sobre a frequência de troca dessas vestimentas, eficiência de higienização e adequação dos locais de circulação dos profissionais com essas vestimentas. Foram identificados diversos episódios em que a espécie de BGN que colonizava o paciente,

tanto para as amostras dependentes ou não dependentes de cultivo, foi encontrada também nos itens do quarto do paciente, sendo que em alguns casos esses BGN apresentaram um perfil de resistência (identificação de genes de resistência ou TSA) e sequência do 16S rDNA (V3/V4) idênticos, indicando eventos de contaminação cruzada, o que demonstra a importância do ambiente hospitalar na disseminação das IRAS (LAX, *et al.* 2017; GAUDART *et al.*, 2013; SHIMOSE *et al.*, 2016; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; LEVIN *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Quase metade dos pacientes apresentou resultados positivos para a presença de BGN em mais de um sítio amostrado (mãos, narinas e reto). As amostras de *swab* retal foram as que apresentaram a maior positividade de BGN isolados, seguido do *swab* nasal e das mãos. Porém, os BGN isolados a partir das amostras nasais e das mãos apresentaram, relativamente, maiores taxas de resistência aos antimicrobianos, provavelmente devido à diferente composição das populações bacterianas (LOZUPONE *et al.*, 2013), fazendo com que esses sítios estivessem mais propensos à colonização por BGN MDR. Estudos sobre a colonização nasal frequentemente são focadas em bactérias Gram-positivas (BESSESEN *et al.*, 2015; KASPAR *et al.*, 2016), porém é importante destacar a alta taxa de colonização por BGN identificada nas amostras de *swab* nasal no presente rastreamento: 23 de 66 pacientes apresentaram pelo menos um BGN nesse sítio, algumas delas MDR e resistentes aos carbapenêmicos.

Durante um semestre de vigilância, para as amostras DC, um total de 390 isolados de BGN foram obtidos. Sete espécies/gêneros (ou complexos) foram responsáveis por 80% (304/380) do total de BGN identificados: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pantoea* spp., *A. baumannii* complex, *E. cloacae* complex e *P. aeruginosa*.

As amostras NDC (1.080) apresentaram as seguintes espécies bacterianas como as mais abundantes: *A. baumannii*, *P. putida*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. stutzeri*, *P. oryzihabitans*, *A. lwoffii*, *P. ursingii*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. dispersa* e *P. aeruginosa*. Como pode-se observar, todas as espécies bacterianas mais frequentemente identificadas nas amostras DC estão contidas nesse grupo. Outras espécies bacterianas se destacam nas amostras NDC, especialmente do gênero *Pseudomonas*. Essas diferenças se devem, provavelmente, às dificuldades de crescimento de certas espécies bacterianas em meios seletivos, nas amostras DC.

As bactérias detectadas em maior abundância, tanto pelo método DC como NDC, frequentemente estão associadas às IRAS de acordo

com estudos brasileiros prévios (RUBIO *et al.*, 2013; KIFFER *et al.*, 20005; MENDES *et al.*, 2005; SADER *et al.*, 2005). Hewitt e colaboradores (2013) destacam em seu trabalho (identificação de bactérias no ambiente e pacientes de duas UTIs neonatais) que a detecção com os métodos baseados em sequenciamento de 16S rRNA recuperou maior diversidade bacteriana do que o habitual, com métodos baseados em cultivo, e que muitos dos gêneros identificados são comumente encontrados em estudos de ambientes hospitalares baseados em cultivo celular e especificamente associados às IRAS em pacientes neonatais, como espécies do gênero *Enterobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*.

Para as amostras DC e NDC, um resultado que chama a atenção é a identificação frequente de *Pantoea* spp. Nas amostras DC esse gênero foi isolado principalmente em amostras do ambiente e em poucas amostras de profissionais da saúde. O mesmo padrão foi observado para as amostras NDC: maior abundância de *Pantoea* spp. em amostras ambientais. *Pantoea* spp., raramente causa infecções oportunistas (SENGUPTA *et al.*, 2016; TIWARI; BERIHA, 2015) e no presente trabalho ela foi identificada raramente em amostras de pacientes, o que indica um papel menos importante nas IRAS. No Brasil, há relatos de surtos por *Pantoea* spp., inclusive com envolvimento de soluções manipuladas de anticoagulante contaminadas, ressaltando a importância da contaminação do ambiente nesses processos (BOSZCZOWSKI *et al.*, 2012; BICUDO *et al.*, 2007). No entanto, alguns autores chamam a atenção para o problema de identificação equivocada de espécies do gênero *Pantoea* (PILLONETTO *et al.*, 2018; REZZONICO; SMITS; DUFFY, 2012; DELÉTOILE *et al.*, 2009). Segundo Rezzonico, Smits e Duffy (2012) há evidências crescentes de que muitas identificações de isolados clínicos de *P. agglomerans* são equivocadas, devido a métodos inadequados de identificação e/ou uso de nomenclatura obsoleta. O complexo *P. agglomerans-Enterobacter agglomerans-Erwinia herbicola* sofreu várias revisões taxonômicas, sendo reconhecido que tanto o perfil bioquímico como o sequenciamento do gene 16S rRNA não possuem a resolução necessária para discriminar isolados de *P. agglomerans*. Os autores afirmam que há demonstrações conclusivas, usando o sequenciamento do gene *gyrB* e identificação por MALDI-TOF MS, de que uma série de isolados clínicos pertencentes a coleções respeitáveis não pertencem ao gênero *Pantoea*, por exemplo, há identificação equivocada para 95,5% das cepas de “*P. agglomerans*” da *American Type Culture Collection* (ATCC) (REZZONICO; SMITS; DUFFY, 2012). Em publicação recente, Pilonetto e colaboradores

(2018) descreveram isolados previamente identificados como *Pantoea agglomerans*, provenientes de eventos de surtos no Brasil, como pertencentes ao gênero *Phytobacter*.

O perfil MDR foi encontrado em 32,6% dos isolados de BGN e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando se comparou as diferentes fontes, PT (42,0%), AH (23,9%) e PS (15,8%), o que demonstra que há uma disseminação homogênea de BGN com perfil MDR na instituição, tanto em pacientes, como profissionais e ambiente. Estudos brasileiros encontraram o perfil MDR em BGN isolados de pacientes em uma taxa que variou de 32% a 48% (ARNONI *et al.*, 2007; TOLEDO *et al.*, 2012). A resistência aos carbapenêmicos foi identificada em 17,7% dos BGN, enquanto que a resistência às cefalosporinas de amplo espectro foi identificada em 38,7% dos BGN. Em pacientes esses percentuais foram de 24,2% e 35,0% respectivamente. Estudos publicados ao longo de mais de uma década no Brasil e na América Latina, que incluem as espécies de BGN prevalentes no presente estudo, reportam taxas muito variáveis para a resistência aos carbapenêmicos em isolados de pacientes. Essas variações se dão principalmente pelos diferentes métodos de isolamento ou devido aos critérios de escolha de isolados a partir do banco de laboratórios de microbiologia clínica dos hospitais. Porém, ao fazer uma média das taxas reportadas, chega-se ao valor de 31,7%, sendo possível observar uma semelhança com a taxa identificada no presente estudo (PAGANO *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2013; FEHLBERG *et al.*, 2012; GALES *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2010; FURTADO *et al.*, 2006; SADER *et al.*, 2005; KIFFER *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2005). O mesmo padrão de similaridade pode ser observado na resistência às cefalosporinas de amplo espectro ou perfil ESBL, pois considerando uma média das taxas reportadas por estudos brasileiros chega-se ao valor de 31,0% (NOGUEIRA *et al.*, 2014; RUBIO *et al.*, 2013; JASKULSKI *et al.*, 2013; JONES *et al.*, 2013; WOLLHEIM *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2005; KIFFER *et al.*, 2005). É importante ressaltar que todos os estudos citados foram conduzidos com isolados de BGN provenientes de pacientes apenas.

As unidades do hospital incluídas no rastreamento mostraram frequências de isolados de BGN com diferenças estatisticamente significativas entre si devido ao centro cirúrgico (CC), que como o esperado apresentou uma baixa frequência de BGN (as demais unidades não apresentaram diferenças significativas entre si. Um resultado semelhante também foi encontrado para as amostras NDC: CRI, CMI e UTI apresentaram proporções semelhantes de *hot spots*, na EMG essa

proporção foi um pouco aumentada e no CC foi menor do que nas demais unidades. Esse resultado indica que a colonização por bactérias associadas às IRAS é um problema sistemático no hospital, com taxas de contaminação similares entre as diferentes unidades. A UTI-B apresentou os resultados mais preocupantes em relação aos perfis de resistência, com altas frequências de BGN MDR, de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos, comparada com as outras unidades, o que confirma uma incidência aumentada de BGN relacionadas às IRAS nessa unidade. Rubio e colaboradores (2013), também encontraram uma diferença significativa entre as BGN MDR de isolados de pacientes provenientes da UTI em relação aos pacientes não provenientes de UTI. Uma possível explicação para essa observação é que a UTI-B é uma UTI adulta que habitualmente recebe pacientes em estado de saúde mais crítico, com maior tempo de internação, o que expõe os próprios pacientes, mas também os profissionais da saúde e o ambiente a uma maior chance de colonização por bactérias multirresistentes. Como esperado, depois da UTI-B, a CMI e a UTI-A mostraram as maiores taxas de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos. Porém, um resultado preocupante foi encontrado para a CRI, que mostrou incidência de BGN MDR mais alta do que na UTI-A e CMI. A CMI é utilizada pelo hospital como uma unidade de isolamento, que recebe quase que exclusivamente pacientes colonizados ou com infecção por bactérias MDR. A CRI recebe pacientes que estão aguardando por uma cirurgia eletiva ou pacientes pós-cirúrgicos. Usualmente, esse tipo de unidade apresenta um tempo de internação menor, porém, de fato, no presente estudo, os pacientes da CRI, comparando-se com pacientes das demais unidades, apresentaram em média o maior tempo de internação (24,3 dias), o que ajuda a explicar a alta incidência de BGN MDR. Além disso, outro fator importante é a alta taxa de rotatividade dos pacientes entre as diversas unidades hospitalares (54,5% dos pacientes estiveram internados em mais de uma unidade do hospital). Esses fatores, associados à falta de um sistema de vigilância eficiente, reforça o problema da ampla disseminação de BGN relacionadas às IRAS na instituição. Como a CRI apresentou taxas de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos menores do que na UTI-A e CMI, a classificação das BGN isoladas na CRI como MDR se deu, na maioria dos casos, pela resistência a outras classes de antimicrobianos (como as cefalosporinas de primeira e segunda geração).

Os isolados da família Enterobacteriaceae apresentaram os resultados mais homogêneos quando se observa as diferentes fontes de

isolamento, com perfis de resistência muito similares entre os três grupos (PT, AH e PS). O perfil identificado em Enterobacteriaceae mostra mais uma vez a sistemática disseminação de BGN em pacientes, profissionais da saúde e ambiente. Das espécies mais importantes da família, *E. coli* apresentou o perfil mais susceptível aos antimicrobianos, enquanto que *K. pneumoniae* e *E. cloacae* complex apresentaram o oposto, com altas taxas do perfil MDR e de resistência aos carbapenêmicos. Os TSA identificados em *E. coli* são muito semelhantes aos encontrados em estudos anteriores realizados no Brasil (JONES *et al.*, 2013; FEHLBERG *et al.*, 2012). Porém, ao comparar os perfis dos TSA de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* complex com dados da literatura algumas diferenças são encontradas. Os TSA apresentados por Jones e colaboradores (2013) e Gales e colaboradores (2012) para *Klebsiella* spp. isoladas de pacientes com IRAS são muito similares aos TSA identificados no presente estudo para *K. pneumoniae* isoladas do ambiente e dos profissionais da saúde. Porém, quando se compara os resultados dos TSA de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes, é possível observar que o presente estudo encontrou taxas mais altas para resistência a imipenem, meropenem, cefalosporinas de amplo espectro (cefepima, ceftazidima e ceftriaxona) e tigeciclina do que os reportados pela literatura (JONES *et al.*, 2013; GALES *et al.*, 2012). Os resultados para a resistência aos carbapenêmicos é especialmente preocupante: Gales e colaboradores (2012) reportaram uma taxa de resistência de 11,3% para imipenem e de 11,1% para meropenem; Jones e colaboradores (2013) reportaram uma taxa de resistência de 7,9% para meropenem, enquanto que no presente estudo os isolados de *K. pneumoniae* de pacientes apresentaram taxa de resistência para ambos os carbapenêmicos de 41,7%. Para *E. cloacae* complex um cenário semelhante foi encontrado: no presente estudo os isolados de pacientes apresentaram maior taxa de resistência do que o reportado na literatura para cefalosporinas (ceftazidima e ceftriaxona), carbapenêmicos, além de piperacilina/tazobactam, gentamicina e tigeciclina (JONES *et al.*, 2013; GALES *et al.*, 2012). Por outro lado, *E. cloacae* complex isolados do ambiente e de profissionais da saúde mostraram perfis de TSA mais similares com os reportados na literatura (JONES *et al.*, 2013; GALES *et al.*, 2012). As taxas de resistência mais discrepantes em relação à literatura foram encontradas para tigeciclina e piperacilina/tazobactam (antimicrobianos de amplo espectro): Jones e colaboradores (2013) não encontraram *Enterobacter* spp. resistentes à tigeciclina e encontraram uma resistência de 10,7% a piperacilina/tazobactam, enquanto que no presente estudo foi encontrada uma taxa de 60,0% de resistência para

ambos. Gales e colaboradores (2012) encontrou uma taxa de resistência de 7,5% para imipenem e 1,5% para meropenem em *Enterobacter* spp., enquanto que, no presente estudo, a taxa de resistência foi de 25,0% para ambos os carbapenêmicos em *E. cloacae* complex isolados de pacientes. Esses dados comparativos demonstram como, em pouco tempo, a resistência aos antimicrobianos, no Brasil e América Latina, cresceu consideravelmente.

É importante enfatizar que o presente estudo inclui BGN isolados de pacientes com infecção ou colonização por BGN relacionados às IRAS, além de isolados de profissionais da saúde e do ambiente, o que chama mais ainda a atenção para as taxas que foram encontradas.

Isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* complex contribuíram de forma significativa para o aumento das frequências de genes codificantes de beta-lactamases em Enterobacteriaceae, o que está de acordo com o que foi encontrado nos testes fenotípicos. A identificação de dois ou mais genes de resistência no mesmo isolado de *K. pneumoniae* ou *E. cloacae* complex ajuda a compreender as altas taxas de perfis MDR que foram encontrados nesses membros da família Enterobacteriaceae. Esses resultados foram corroborados pelos dados das amostras não dependentes de cultivo.

O gene *bla*_{SHV-like} mostrou uma alta frequência em comparação aos demais genes de resistência testados, chegando a 91,7% e 87,5% em *K. pneumoniae* identificada em pacientes para as amostras DC e NDC, respectivamente. As frequências encontradas para esse gene tanto para a família Enterobacteriaceae como para espécies específicas estão de acordo com estudos prévios (NOGUEIRA *et al.*, 2015; TOLLENTINO *et al.*, 2011; WOLLHEIM *et al.*, 2011; MARRA *et al.*, 2011; MINARINI *et al.*, 2009; MINARINI *et al.*, 2008). Os genes dos grupos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-9} foram os mais frequentes da família CTX-M. Por exemplo, *bla*_{CTX-M-1} group foi encontrado em 37,5% e 50,0% de *K. pneumoniae* identificadas em pacientes, nas amostras DC e NDC, respectivamente. Essas frequências são similares àquelas encontradas em diversos estudos brasileiros (TAVARES *et al.*, 2015; TOLLENTINO *et al.*, 2011; VASQUES *et al.*, 2011; PEIRANO *et al.*, 2009; MINARINI *et al.*, 2009; MINARINI *et al.*, 2008), exceto ao encontrado por Peirano e colaboradores (2011) e Seki e colaboradores (2013), que reportaram frequências mais altas para o grupo *bla*_{CTX-M-1} (64,0% e 55,9% respectivamente). O grupo *bla*_{CTX-M-2} foi identificado no presente estudo, porém em baixa frequência assim como reportado pela literatura (TAVARES *et al.*, 2015; JASKULSKI *et al.*, 2013; PEIRANO *et al.*, 2011). Porém, outros estudos reportaram frequências

mais altas de *bla*_{CTX-M-2} group em Enterobacteriaceae, com resultados entre 52,3% e 89,3% (NOGUEIRA *et al.*, 2015; TOLLENTINO *et al.*, 2011; SEKI *et al.*, 2013). Para *bla*_{KPC-like} foram encontradas frequências de 6,4% e 13,6% para Enterobacteriaceae presentes em amostras DC e NDC, respectivamente, similar ao encontrado por Jaskulski e colaboradores (2013) e Ribeiro e colaboradores (2013). Para *K. pneumoniae* identificadas em pacientes, *bla*_{KPC-like} foi encontrado em 33,3% e 41,7% nas amostras DC e NDC, respectivamente, de acordo com o que foi encontrado por Rieger e colaboradores (2016), Tuon e colaboradores (2012) e Cabral e colaboradores (2012).

Diferentemente do que foi encontrado na família Enterobacteriaceae, para o gênero *Acinetobacter* foram encontradas taxas maiores de resistência aos antimicrobianos em isolados de pacientes do que em isolados de profissionais da saúde e do ambiente hospitalar. As taxas de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos e MDR foram muito altas em pacientes colonizados ou com infecção, sendo que *Acinetobacter baumannii* complex tem um papel central nessa observação. Os perfis de TSAs encontrados para *Acinetobacter* spp. isolados de pacientes foi similar a outros estudos brasileiros e latino-americanos, com algumas diferenças: Martins e colaboradores (2014) encontraram em *A. baumannii* MDR da região sudeste do Brasil uma taxa de resistência à amicacina de 78,1%, à polimixina B de 39,0% e à gentamicina de 84,3%, enquanto que no presente estudo não foi detectada resistência à amicacina e colistina (polimixina E), e para gentamicina a resistência foi de 46,2% em *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes (não necessariamente MDR); Gales e colaboradores (2012) também encontraram uma taxa mais alta de resistência à amicacina (59,1%), porém a resistência ao imipenem e ao meropenem foi mais baixa do que no presente estudo (73,0% e 72,7%, respectivamente, contra 92,3% no presente estudo para ambos os carbapenêmicos); da mesma forma, Jones e colaboradores (2013) também encontraram resistência mais alta à amicacina (67,6%) e resistência mais baixa ao imipenem e meropenem (75,7% e 75,5 respectivamente) em isolados de *A. baumannii*.

A frequência em que *bla*_{OXA-23-like} encontrada em *Acinetobacter* spp. identificadas em pacientes, tanto nas amostras DC como NDC foi a mesma 92,3%, e esta também foi a taxa de resistência aos carbapenêmicos, o que mostra a importância desse grupo de genes codificadores de carbapenemases para esse gênero. As taxas de resistência de *Acinetobacter* spp. isolados de pacientes aos carbapenêmicos reportadas em estudos brasileiros variam de 30,0% a

91,2% (TOLEDO *et al.*, 2012; PAGANO *et al.*, 2015; GALES *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2011; FURTADO *et al.*, 2006) e as frequências de *bla*_{OXA-23-like} variam entre 41,7% e 100% (PAGANO *et al.*, 2015; FEHLBERG *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2011; MARRA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2016; CAMARGO *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2015; PAGANO *et al.*, 2013; CIESLINSKI *et al.*, 2013; CLÍMACO *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2012; CORRÊA *et al.*, 2012; ANTONIO *et al.*, 2011; FURTADO *et al.*, 2011; BIER *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009). No presente estudo, nas amostras DC e NDC correspondentes, respectivamente, 42,3% e 31,3% de *Acinetobacter* spp. identificadas em pacientes, ambiente e profissionais da saúde foram positivas para *bla*_{OXA-23-like}. A ausência de *bla*_{OXA-51-like} em alguns isolados de *A. baumannii* complex, que inclui as espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* (NEMEC *et al.*, 2011), permitiu que fosse realizada a correta identificação de 22 isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii* por sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA. Apenas um isolado que não apresentou *bla*_{OXA-51-like} teve a espécie *A. baumannii* confirmada pelo sequenciamento, além de terem sido identificadas espécies pertencentes ao complexo *A. baumannii* (como *A. calcoaceticus* e *A. nosocomialis*) e não pertencentes ao complexo (como *A. soli*). O complexo *A. baumannii* é responsável pela maioria das infecções e surtos hospitalares envolvendo *Acinetobacter* spp., no entanto, as espécies que compõe o complexo são de difícil distinção pelos métodos fenotípicos convencionais (DOUGHARI *et al.*, 2011), podendo ocorrer erros de identificação. A presença de *bla*_{OXA-51-like} é comumente utilizada como um marcador para a espécie *A. baumannii*, porém esse recurso deve ser avaliado com cuidado (ZANDER *et al.*, 2013). Um estudo conduzido por Vasconcelos e colaboradores (2015) reportou a ausência do gene *bla*_{OXA-51-like} em isolados de *Acinetobacter* spp. excetuando-se *A. baumannii* (chamados não-*baumannii*), enquanto Teixeira e colaboradores (2013) reportou uma frequência de 41,7% em isolados *Acinetobacter* não-*baumannii*. Ainda em *Acinetobacter* spp., tanto para as amostras dependentes e não dependentes de cultivo, não foi detectado o gene *bla*_{OXA-143-like}, enquanto que outros estudos brasileiros reportam tanto a ausência (PAGANO *et al.*, 2015; PAGANO *et al.*, 2013; CIESLINSKI *et al.*, 2013), como baixas – entre 8,4 e 18,6% (WERNECK *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2016) – e altas frequências – entre 58,3 e 76,0% para *bla*_{OXA-143-like} (ANTONIO *et al.*, 2011; MOSTACHIO *et al.*, 2012). Alguns estudos reportam a ausência ou baixa frequência de *bla*_{OXA-58-like} (PAGANO *et*

al., 2015; CLÍMACO *et al.*, 2013; ANTONIO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2011) e *bla*_{OXA-72-like} (MARTINS *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2015; ANTONIO *et al.*, 2011; CHAGAS *et al.*, 2014), restritos a hospitais da região sudeste do Brasil, na maioria dos casos, enquanto que no presente estudo esses dois genes não foram detectados.

Os perfis dos TSAs para *P. aeruginosa* isoladas de pacientes foi muito similar aos reportados previamente por Jones e colaboradores (2013), enquanto Gales e colaboradores (2012) encontraram taxas mais altas de resistência a todos os antimicrobianos testados do que no presente estudo. Em ambos os estudos pôde-se observar taxas mais altas de resistência aos carbapenêmicos, entre 38,4% e 46,7%, do que no presente estudo (21,1% para meropenem e 26,3% para imipenem em *P. aeruginosa* de pacientes). Em *P. aeruginosa* ressalta-se a presença do gene *bla*_{SPM-like} (15,8% para pacientes, tanto para as amostras dependentes como não dependentes de cultivo) na definição do perfil MDR. Estudos prévios com *P. aeruginosa* reportam frequências de *bla*_{SPM-like} entre 4,5% e 5,9% (SADER *et al.*, 2005; FEHLBERG *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2010), enquanto estudos com *P. aeruginosa* com perfil MDR ou resistentes aos carbapenêmicos variam de 17,8% a 64,1% (FRANCO *et al.*, 2010; MARRA *et al.*, 2011; RIZEK *et al.*, 2014; LUCENA *et al.*, 2014; POLOTTO *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006).

Apesar da descrição de diversos casos da presença do gene *bla*_{NDM-like} em isolados de BGN de diferentes espécies no Brasil (PAGANO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015; QUILES *et al.*, 2015; PILLONETTO *et al.*, 2014; CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014; CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013) o presente estudo não identificou esse grupo de genes de carbapenemases nas amostras dependentes de cultivo, o que pode ser explicado pela baixa incidência no país: 0,97% em Enterobacteriaceae de acordo com Rozales e colaboradores (2014). No entanto, esse gene foi identificado em baixa frequência (0,5%) em amostras NDC. As amostras positivas pertenciam à CRI e ao CC (unidades relacionadas) e continham a mesma espécie em abundância: *Acinetobacter johnsonii*. Esse resultado foi confirmado por sequenciamento dos amplicons de *bla*_{NDM-like}. Os genes codificadores de metalo-beta-lactamases (MBL), *bla*_{IMP-like} e *bla*_{VIM-like}, e das carbapenemases GES, *bla*_{GES-like}, também não foram identificados nos isolados bacterianos, no entanto, os genes *bla*_{IMP-like} e *bla*_{VIM-like} foram identificados em baixa frequência nas amostras não dependentes de cultivo, assim como o encontrado em outros estudos brasileiros, que

identificaram esses genes em baixa frequência em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (FEHLBERG *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2010; MARRA *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2016; MOSTACHIO *et al.*, 2012; RIZEK *et al.*, 2014; POLOTTO *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2016; CAMARGO *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que todos os estudos citados na revisão de literatura foram conduzidos com BGN isolados a partir de amostras de pacientes e que a identificação dos genes de resistência foi restrita, na maioria dos casos, a BGN resistentes (MDR, ESBL, MBL ou resistentes aos carbapenêmicos, por exemplo), sendo um importante viés para as análises comparativas.

Um dado do presente trabalho que chamou bastante a atenção foi a diferença encontrada no padrão de colonização para a família Enterobacteriaceae comparada aos gêneros *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp nas amostras dependentes de cultivo. A família Enterobacteriaceae mostrou uma disseminação similar entre pacientes, ambiente e profissionais da saúde, um padrão não observado para os outros dois gêneros. Em *Pseudomonas* spp. o perfil MDR foi identificado somente em pacientes – nenhuma das *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras ambientais mostrou perfil MDR. Para *Acinetobacter* spp. foi observada uma alta resistência aos carbapenêmicos em isolados provenientes de pacientes, enquanto que isolados de ambiente e profissionais da saúde mostraram uma taxa muito menor, com uma diferença estatisticamente significativa. É reconhecida a habilidade de *Acinetobacter* spp. na formação de biofilme em superfícies abióticas, tornando-se um problema preocupante nas instituições de saúde (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014), assim como *Pseudomonas* spp., também formadora de biofilme (KAISER *et al.*, 2017). Um estudo recente conduzido por Hu e colaboradores (2016) mostrou que isolados de *A. baumannii* esporádicos tiveram uma grande habilidade em formar biofilme se comparadas com isolados de *A. baumannii* epidêmicos ou provenientes de surtos. Outro estudo conduzido por Perez (2015) no Brasil, mostrou que *A. baumannii* resistentes a meropenem mostraram uma habilidade reduzida em produzir biofilme se comparada a isolados de *A. baumannii* susceptíveis a meropenem. Kaiser e colaboradores (2017) observaram que *P. aeruginosa* extensivamente resistentes (XDR) têm habilidade elevada de formar biofilme se comparado aos isolados não-XDR, porém as cepas endêmicas mostraram resultados controversos, com alta habilidade em formar biofilme observado para todos os grupos. Esses dados da literatura dão suporte à hipótese que *A. baumannii* ou *P. aeruginosa*

multirresistentes, identificadas em pacientes, são menos propensas a colonizar de forma persistente superfícies abióticas, uma vez que teriam potencial menor de formar biofilmes. Assim, há possibilidade de que a formação de biofilme por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (as duas espécies mais frequentemente identificadas no presente trabalho para esses dois gêneros) com padrão maior de susceptibilidade aos antimicrobianos poderia “proteger” as superfícies da colonização por cepas multirresistentes, o que explicaria a diferença entre os perfis de resistência identificados em amostras do ambiente e de pacientes, não observada em Enterobacteriaceae. Mas essa hipótese deve ser comprovada experimentalmente.

Outro dado que também merece destaque é sobre a colonização dos diferentes sítios de pacientes por uma mesma bactéria, com alta taxa de resistência. Dois casos de pacientes que mostraram colonização por BGN nos três sítios (mãos, narinas e reto) envolveram *P. aeruginosa* isolada de um paciente da UTI e *K. pneumoniae* isolada em um paciente da CMI. Em ambos os casos os BGN estavam presentes nos três sítios de isolamento e com um perfil de resistência MDR (com resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de amplo espectro). Esses dados demonstram mais uma vez a importância das práticas de higienização e da vigilância de pacientes, com atenção especial aos eventos de quebra de barreira, uma vez que a colonização de sítios como as mãos facilita a contaminação de equipamentos dos leitos e de profissionais da saúde com BGN MDR, assim como pode dificultar o tratamento do paciente, uma vez que um evento de recolonização pode ocorrer.

Por fim, as análises do sequenciamento de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA permitiram avaliar a dinâmica das espécies que compõe o microbioma hospitalar. O microbioma de ambientes construídos tem algumas das suas implicações mais profundas para os estabelecimentos de saúde, onde as IRAS há muito tempo estão entre as principais causas de mortes de pacientes. É essencial entender a ecologia desses ambientes e elucidar os mecanismos pelos quais o microbioma pode influenciar as IRAS (LAX; GILBERT, 2015).

Os índices de alfa-diversidade analisados de acordo com diferentes critérios, permitiram observar padrões semelhantes entre as unidades hospitalares; demonstraram também que as amostras de pacientes tendem a apresentar uma riqueza menor de espécies, do que o observado nas demais amostras de profissionais e do ambiente hospitalar, com perfil de dominância de algumas espécies.

As análises de beta-diversidade demonstram que houve

similaridade da diversidade de bactérias associadas às IRAS ao longo dos seis meses pesquisados, bem como entre as diferentes unidades hospitalares e locais de coleta de amostras. No estudo do microbioma hospitalar conduzido por Lax e colaboradores (2017) as análises de beta-diversidade permitiram identificar uma diferenciação da comunidade bacteriana antes e após a abertura do hospital, ou seja, uma mudança efetiva ocorreu após o hospital se tornar funcional.

No presente estudo somente as amostras de pacientes apresentam uma tendência à maior correlação entre si e diferenciação em relação aos demais tipos de amostras, fato que pode ser explicado, principalmente, pelas amostras de *swab* retal, uma vez que a composição microbiana intestinal influi fortemente para a maior prevalência de espécies bacterianas de filos específicos, além do estado de infecção, que também colabora para diminuição da diversidade bacteriana observada (HMPC, 2013; GRICE; SEGRE, 2012). Ao analisar as amostras de pacientes em separado, foi possível observar similaridade entre as amostras das mãos e narinas de pacientes, que se diferenciaram das amostras de *swab* retal. Análises de amostras de pacientes e profissionais da saúde, permitiram mostrar por meio da beta-diversidade a proximidade de amostras de *swab* retal e vestimenta dos profissionais, por exemplo, demonstrando possíveis rotas de disseminação de bactérias associadas às IRAS. Lax e colaboradores (2017) conseguiram demonstrar que as comunidades bacterianas dos pacientes e as superfícies dos seus leitos tornaram-se cada vez mais semelhantes ao longo da permanência do paciente, comprovando a interação do microbioma do paciente e do ambiente hospitalar.

O *heatmap* (Figura 54) elaborado a partir das bactérias associadas às IRAS detectadas em maior abundância nas amostras dos diferentes locais/sítios de coleta permitiu observar a similaridade entre as amostras de profissionais e seus locais de descanso e trabalho, que se diferenciaram das amostras de pacientes. No estudo de Lax e colaboradores (2017) os padrões de beta-diversidade permitiram o agrupamento das amostras em três conjuntos: i) amostras da pele de pacientes, amostras de nariz da equipe de profissionais da saúde e luvas de látex não utilizadas; ii) amostras de piso e a maioria das amostras dos postos de enfermagem; iii) amostras das vestimentas dos profissionais da saúde e pertences pessoais, como sapatos e telefones celulares.

No presente estudo foram identificadas em maior abundância espécies da família Enterobacteriaceae, bem como *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Em algumas amostras específicas, como as mãos e narinas dos pacientes, foram identificadas espécies do gênero

Staphylococcus em abundância. No estudo de Lax e colaboradores (2017), foram identificadas no período pós-abertura a abundância de espécies relacionadas à pele humana, como *Staphylococcus* e *Streptococcus* (aumento da diversidade de *Shannon*) e declínio de *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

Os perfis taxonômicos identificados também permitiram observar a ampla dispersão das bactérias associadas às IRAS nas unidades hospitalares incluídas no presente estudo, bem como entre pacientes, profissionais e o ambiente hospitalar – há uma dinâmica contínua e complexa dessas bactérias, levando a uma colonização do ambiente de forma homogênea, com espécies relevantes no contexto das IRAS apresentando-se como as mais abundantes.

8 CONCLUSÕES

- Há concordância entre as abordagens DC e NDC e entre os métodos fenotípico e genotípico para a identificação de espécies ou gêneros de bactérias associadas às IRAS.
- Foi possível associar os perfis de resistência das amostras DC aos genes de resistência aos beta-lactâmicos identificados.
- Foi possível recuperar pelo método NDC frequências semelhantes dos genes de resistência àquelas identificadas pelo método DC.
- Não há diferenças significativas nas distribuições de bactérias associadas às IRAS entre pacientes, profissionais da saúde e o ambiente hospitalar e nas diferentes unidades hospitalares.
- Pacientes apresentaram alta taxa de IRAS e colonização por bactérias multirresistentes devido aos fatores de risco aos quais foram expostos.
- Os profissionais da saúde demonstraram preocupação em relação às suas condições de trabalho no que concerne ao controle de IRAS. Foram identificadas contaminações por bactérias associadas às IRAS em mãos e vestimentas de profissionais de saúde.
- As bactérias associadas às IRAS são as mais abundantes no microbioma hospitalar, trazendo sérias implicações para o controle e combate de tais infecções.
- As análises NDC permitiram identificar pontos críticos de contaminação, que não se diferenciaram dos resultados obtidos pelo método DC. No entanto, as análises NDC permitiram identificar de forma amplificada a distribuição e recorrência dos *hot spots* de contaminação.
- As análises NDC permitiram identificar o microbioma hospitalar de forma rápida e efetiva, recuperando a partir de uma única amostra, sem necessidade de etapas de cultivo e isolamento, todos os dados sobre a diversidade bacteriana e frequências de genes de resistência aos antimicrobianos, sem restrição a grupos bacterianos específicos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse é o primeiro estudo que realizou a pesquisa do microbioma e um rastreamento extensivo de bactérias associadas às IRAS, bem como a caracterização de seus perfis de resistência em um hospital público situado em país em desenvolvimento, correlacionando achados de pacientes, ambiente e profissionais da saúde.

Este estudo auxiliou o entendimento sobre a colonização de um hospital por bactérias associadas às IRAS comparando duas abordagens diferentes de rastreamento, dependente e não dependente de cultivo, o que permitiu demonstrar o potencial das técnicas moleculares em constituir-se como ótimas ferramentas para programas de vigilância microrganismos multirresistentes. Além disso, a facilidade da coleta, a possibilidade do processamento em larga escala e a recuperação de um amplo grupo de bactérias, independentemente de suas condições de cultivo, fazem com que as técnicas de biologia molecular possam inserir um importante incremento no combate às IRAS, atuando de forma preventiva e também resolutiva.

Os resultados apresentados demonstram que a disseminação de bactérias associadas às IRAS no ambiente hospitalar é maior do que o previsto, o que indica que profissionais da saúde, o ambiente e equipamentos hospitalares são fatores chaves na disseminação de bactérias multirresistentes. Os pontos críticos de contaminação identificados devem ser alvo de processos de intervenção mais severos e continuados. Recomenda-se um plano de ação educacional para os profissionais de saúde, de forma que possam auxiliar a reverter o quadro de risco no qual as unidades hospitalares se encontram. Há necessidade do envolvimento de todas as esferas, desde a direção do hospital, até os profissionais e usuários do sistema de saúde. A instituição encontra-se em risco iminente de surtos por bactérias associadas às IRAS, uma vez que diversos repositórios latentes de bactérias multirresistentes puderam ser identificados e os padrões de contaminação se mostraram constantes ao longo do tempo e espaço.

O cenário encontrado no hospital investigado pode ser extrapolado para hospitais do sistema de saúde público brasileiro, de forma a reorientar práticas aplicadas ao controle de IRAS. Um programa de vigilância ativo pode ser uma ferramenta poderosa no entendimento e controle das IRAS, porém, é importante ressaltar que o maior desafio a ser encarado com a implementação de uma vigilância ativa é que isso requer uma liderança formal e uma equipe comprometida que possa utilizar bem todo o potencial dos resultados.

Fournier e colaboradores (2013) relatam que ao se comparar técnicas mais tradicionais de detecção, uma abordagem mais ampla de procura parece ser desvantajosa, porém, que o aumento dos custos laboratoriais pode ser balanceado pela hospitalização mais curta devido ao diagnóstico mais rápido e a utilização precoce do antimicrobiano apropriado, evitando tratamentos desnecessários. A introdução das tecnologias chamadas “ômicas” (proteômica, transcriptômica, metabolômica e, em especial, a genômica) em laboratórios de microbiologia clínica traz novos desafios, sobre como obter um diagnóstico no menor tempo possível para um tratamento e tomada de decisão eficientes. No entanto, esse é um caminho inevitável. Essas novas tecnologias tem o potencial de permear várias frentes de combate às IRAS, desde fornecer o poder de detecção precoce, a rapidez na resposta diagnóstica e a acurácia metodológica, que são primordiais e podem fazer a diferença entre o sucesso e o fracasso do controle de surtos e da endemicidade de microrganismos multirresistentes, até na conscientização e educação dos profissionais da saúde, auxiliando-os na adoção das melhores práticas para segurança do paciente e na promoção de um ambiente de trabalho mais saudável, em benefício a eles mesmos, aos pacientes e a comunidade como um todo.

Segundo Cardo e colaboradores (2010):

“O progresso em direção à eliminação de IRAS é real. Devemos continuar a trabalhar juntos para aumentar a adesão às práticas apontadas para prevenção e para o alinhamento de incentivos, tais como a responsabilidade institucional e pessoal, para acelerar a eliminação de IRAS. Devemos investir na investigação para encontrar soluções inovadoras para vencer os desafios, tais como a resistência antimicrobiana, a taxa crescente de IRAS fora dos ambientes tradicionais de atenção à saúde (hospitais) e a reestruturação dos pacotes de medidas de intervenção existentes, de forma a serem os mais seguros e custo-efetivos possíveis. Devemos ser flexíveis e responsivos aos desafios emergentes e às constantes mudanças desses ambientes de atenção à saúde. Acima de tudo, devemos nos concentrar no paciente e devemos nos desafiar a não aceitar mais o inaceitável. IRAS são evitáveis. Devemos trabalhar juntos para eliminar as IRAS para as gerações futuras”.

REFERÊNCIAS

- Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037–50.
- Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, *et al*. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9761):228–41.
- Allegranzi B, Pittet D. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):305–15.
- Allegranzi B, Sax H, Pittet D. Hand hygiene and healthcare system change within multi-modal promotion: A narrative review. *J Hosp Infect*. 2013;83(SUPPL. 1):S3–10.
- Alp E, Damani N. Review Healthcare-associated infections in Intensive Care Units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(10):1040-5.
- Ansaldi F, Canepa P, Bassetti M, Zancolli M, Molinari MP, Talamini A, *et al*. Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. *J Hosp Infect*. 2011;79(2):134–40.
- Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. [S.l.]: Chapman and Hall, 1991.
- Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, De Araújo MRE, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1322–1323.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta de Tecnolovigilância. Alerta 2300. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/sistec/alerta/RelatorioAlerta.asp?NomeColuna=CO_S EQ_ALERTA&Parametro=2300. Acesso em 02/05/2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Vol. 1, n. 1, 2011a.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica n. 01/2014. Vigilância e Monitoramento das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM) em serviços de saúde, 2014a.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Indicador nacional das infecções relacionadas à assistência à saúde. Vol. 1, n. 3, 2011c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Ano 2, n. 4, 2012a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Indicador de infecção primária em corrente sanguínea: análise dos dados das unidades de terapia intensiva brasileiras no ano de 2011. Ano 2, n. 5, 2012b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Indicador nacional de infecção hospitalar - infecção primária de corrente sanguínea associada a cateter venoso central: análise dos dados das unidades de terapia intensiva brasileiras no ano de 2012. Ano 3, n. 6, 2013d.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: resistência microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012). Ano 4, n. 7, 2014b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Infecção primária da corrente sanguínea: análise do indicador nacional das unidades de terapia intensiva brasileiras no ano de 2013. Ano 4, n. 8, 2014c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente, relacionadas ao uso de cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2013). Ano 5, n. 9, 2014d.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Incidentes relacionados à assistência à saúde – 2014. Ano 6, n. 10, 2015a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2014 e relatório de progresso. Ano 6, n. 11, 2015b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2014). Ano 6, n. 12, 2015c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Incidentes relacionados à assistência à saúde – 2015. Ano 7, n. 13, 2016b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2015. Ano 7, n. 14, 2016c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo - Segurança do paciente e qualidade assistencial em serviços de saúde. Prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde. Vol. 1, n. 2, 2011b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios diagnósticos de infecções relacionadas à assistência à saúde, 2013a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios diagnósticos de infecções relacionadas à assistência à saúde, 2017a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, 2010a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, 2017b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica n. 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes, 2010b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica n. 1/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes, 2013c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perfil de suscetibilidade dos microrganismos - Análise dos dados de 2006 e 2007. Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2013 – 2015), 2013b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2016-2020), 2016a.

Araujo BF, Ferreira ML, De Campos PA, Royer S, Batistão DWDF, Dantas RCC, *et al.* Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *P. aeruginosa* carrying aac(6')-ib-cr, qnrS1 and blaSPM genes in Brazil. PLoS One. 2016;11:1–15.

- Arnoni M V, Berezin EN, Martino MD. Risk factors for nosocomial bloodstream infection caused by multidrug resistant Gram-negative bacilli in pediatrics. *Brazilian J Infect Dis.* 2007;11:267–271.
- Azarian T, Cook RL, Johnson JA, Guzman N, Mccarter YS, Gomez N, et al. Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Neonatal Intensive Care Unit: Time for Routine Practice? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36(7).
- Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(6):583–591.
- Bartley JM, Olmsted RN, Haas J. Current views of health care design and construction: practical implications for safer, cleaner environments. *Am J Infect Control.* 2010;38(5 Suppl 1):S1-12.
- Bessesen MT, Kotter CV, Wagner BD, Adams JC, Kingery S, Benoit JB, et al. MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. *J Infect.* 2015;71:649–657.
- Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FFS, Rage RI. Nosocomial Outbreak of *Pantoea agglomerans* in a Pediatric Urgent Care Center. *BJID Brazilian J Infect Dis.* 2007;1111(2812):281–4.
- Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, do Nascimento AJ, et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control.* 2010;38:308–314.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42–51.
- Bonomo RA. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1).
- Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39(1):79-101.
- Boszczowski I, De Almeida Júnior JN, De Miranda JP, Freire MP, Guimarães T, Chaves CE, et al. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* bacteraemia associated with contaminated anticoagulant citrate dextrose solution: New name, old bug? *J Hosp Infect.* 2012;80:255–258.
- Brasil. Lei n. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 1990.
- Brasil. Lei n. 9.431 de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de programas de controle de infecção hospitalar pelos hospitais do

país. Brasília: Diário Oficial da União, 1997.

Brasil. Lei n. 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Dispõe sobre a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Diário Oficial da União, 1999.

Brasil. Ministério Da Saúde. Portaria n. 196 de 24 de junho de 1983. Dispõe sobre instruções para o controle e a prevenção das infecções hospitalares. Brasília: Diário Oficial da União, 1983.

Brasil. Ministério Da Saúde. Portaria n. 2.616 de 12 de maio de 1998. Brasília: Diário Oficial da União, 1998.

Brasil. Ministério Da Saúde. Portaria n. 232 de 04 de abril de 1987. Dispõe sobre a criação do Programa Nacional de Infecção Hospitalar. Brasília: Diário Oficial da União, 1987.

Brasil. Ministério da saúde. Portaria n. 529 de 01 de abril de 2013. Institui o Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP). Brasília: Diário Oficial da União, 2013.

Bray JR, Curtis JT. An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27:325-349.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Missão e Objetivo. Disponível em: <http://brcast.org.br/missao-e-objetivo/>. Acesso em 02/05/2018.

Brooks B, Firek BA, Miller CS, Sharon I, Thomas BC, Baker R, *et al*. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome*. 2014;2(1):1.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:572–578.

Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T. Detection of SPM and IMP metallo-beta-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Brazilian J Infect Dis*. 2011;15:478–481.

Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, De Vasconcellos FM, Dos Santos LF, Romero EC, *et al*. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15 and 79. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:2545–2547.

Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LEF, Polato A, *et al*. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. *AJIC Am J Infect Control*. 2016;44(11):1374-1380.

Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern

colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(3):415-420.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, *et al*. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012;6(8):1621-4.

Cardo D, Dennehy PH, Halverson P, Fishman N, Kohn M, Murphy CL, *et al*. Moving toward elimination of healthcare-associated infections: A call to action. *Am J Infect Control*. 2010;38(9):671-5.

Carling PC, Bartley JM. Evaluating hygienic cleaning in health care settings: what you do not know can harm your patients. *Am J Infect Control*. 2010 Jun;38(5 Suppl 1):S41-50.

Carvalho APD, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA de P, Teixeira LM, Marques E de A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*. 2006;12:103-8.

Carvalho KR, Carvalho-Assef APDA, Peirano G, Santos LCG dos, Pereira MJF, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:25-28.

Carvalho-Assef APD, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, *et al*. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:2956-2957.

Carvalho-Assef APDA, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TPG, *et al*. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:2475-2476.

CDC. Centers for Control Disease and Prevention. 5 Tips for Patients. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/patientsafety/patient-safety.html>. Acesso em 26/02/2017.

CDC. Centers for Control Disease and Prevention. National and state healthcare associated infections – progress report, 2016. Atlanta, GA.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta, GA.

Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:468-472.

Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand Stat Theory Appl*. 1984;11:265-270.

- Christoff AP, Sereia AFR, Boberg DR, Moraes RLV, de Oliveira LFV. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. Neoprospecta Microbiome Technologies. 25 may 2017. Disponível em <https://neoprospecta.s3.amazonaws.com/docs/Neoprospecta+-+White+Paper+-+Bacterial+NGS+sequencing+2017.pdf>.
- Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, *et al.* Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:337–340.
- Clímaco EC, Oliveira ML de, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, Da Costa Darini AL. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infect Genet Evol.* 2013;19:127–133.
- Corrêa LL, Botelho LAB, Barbosa LC, Mattos CS, Carballido JM, de Castro CLT, *et al.* Detection of bla(OXA-23) in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 2012;16:521–6.
- Cunha, PA. Identificação e caracterização fenotípica e genotípica de enterobactérias isoladas de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar. Dissertação (mestrado Biotecnologia e Biociências), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 155. 2017.
- Dancer SJ. Hospital cleaning in the 21st century. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(12):1473-81.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417–33.
- Dedesko S, Stephens B, Gilbert JA, Siegel JA. Methods to assess human occupancy and occupant activity in hospital patient rooms. *Build Environ.* 2015;90:136–45.
- Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, *et al.* Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2009;47(2):300–10.
- Dettenkofer M, Ammon A, Astagneau P, Dancer SJ, Gastmeier P, Harbarth S, *et al.* Infection control - a European research perspective for the next decade. *J Hosp Infect.* 2011;77(1):7-10.
- Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2012;13(9):601–12.

Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 2011;26(2):101–12.

Dunne WM, Westblade LF, Ford B. Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(8):1719–26.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014, 2015. Stockholm.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance of microorganisms reported in healthcare-associated infections (HAIs). Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/point-prevalence-survey/Pages/point-prevalence-survey-infographics.aspx. Acesso em: 26/02/2017a.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012, 2013a. Stockholm.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals - protocol version 5.3, PPS 2016–2017, 2016. Stockholm.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Summary: point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European hospitals 2011–2012, 2013b. Stockholm.

El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):1–19. Epub 2007 Jun 9.

Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation.* 1992;61:1–10.

Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016;21(17).

Fehlberg LCC, Xavier DE, Peraro PP, Marra AR, Edmond MB, Gales AC. Strains Causing Bloodstream Infections: Comparative Results Between Brazilian and American Isolates. *Microb Drug Resist.* 2012;18:402–407.

Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonca-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS. First report of the *bla*(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:368–370.

- Fitzpatrick MA, Ozer EA, Hauser R. Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing *Acinetobacter* Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):593–612.
- Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CRV, Barth AL, Carneiro ICdRS, Giamberardino HIG, Rodrigues JLN, Santos Filho L, de Mello MJG, Pereira MS, Gontijo Filho P, de Medeiros EAS, Rocha M, Pignatari ACC. Multistate survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *J Hosp Infect*. 2017;96(2):139-144.
- Fournier P-E, Drancourt M, Colson P, Rolain J-M, Scola B La, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(8):574–85.
- Fournier P-E, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med*. 2014;6(11):114.
- Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (São Paulo)*. 2010;65:825–829.
- Furtado GH, Cavalcante AC, Medeiros EA, Gales AC, Oliveira VG, Girardelo R. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: Epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control*. 2011;39:706–708.
- Furtado GH, Martins ST, Machado AM, Wey SB, Medeiros EA. Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in Sao Paulo, Brazil: a 7-year study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27:1270–1273.
- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:354–360.
- Gaudart J, Cloutman-Green E, Guillas S, D’Arcy N, Hartley JC, Gant V, *et al*. Healthcare Environments and Spatial Variability of Healthcare Associated Infection Risk: Cross-Sectional Surveys. *PLoS One*. 2013;8(9):1–8.
- Grice EA, Segre JA. The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13: 151–170.
- Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL, Jakobsen L, Stegger M, Andersen PS, *et al*. Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of bla NDM-1 to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(11):3117-3124.
- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J*

Antimicrob Chemother. 2009;64 Suppl 1:i3–10.

Hawkey PM. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A product of globalization. *J Hosp Infect.* 2015;89(4):241–7.

Hewitt KM, Mannino FL, Gonzalez A, Chase JH, Caporaso JG, Knight R, *et al.* Bacterial Diversity in Two Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *PLoS One.* 2013;8(1):e54703.

HHS. US Department of Health and Human Services. National action plan to prevent health care-associated infections: road map to elimination, 2013.

HHS. US Department of Health and Human Services. National targets and metrics. Disponível em: <https://health.gov/hcq/prevent-hai-measures.asp>. Acesso em 26/02/2017.

Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, *et al.* SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol.* 2016;65(7):696-7.

Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36(5):309–32.

Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis.* 2004;39(8):1182–9.

Hu, Lihua H, Xiaoxia T, Fanliang M, Jianzhong Z. Biofilm may not be Necessary for the Epidemic Spread of *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep.* 2016;6:32066.

Huslage K, Rutala WA, Sickbert-Bennett E, Weber DJ. A Quantitative Approach to Defining “High-touch” Surface in Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(8):850–3.

Jaccard P. The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytol.* 1912;11:37–50.

Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161–82.

Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761–4.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges J V, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, *et al.* Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42:76–79.

- Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(5):526–535.
- Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, *et al*. Susceptibility rates in Latin American nations: Report from a regional resistance surveillance program (2011). *Brazilian J Infect Dis*. 2013;17:672–681.
- Kaiser SJ, Mutters NT, DeRosa A, Ewers C, Frank U, Günther F. Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(2):243–253.
- Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, *et al*. 2016. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ Microbiol* 18:2130–2142.
- Kelley ST, Gilbert JA. Studying the microbiology of the indoor environment. 2013;1–9.
- Kembel SW, Jones E, Kline J, Northcutt D, Stenson J, Womack AM, *et al*. Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome. *ISME J*. 2012;6(8):1469–79.
- Kembel SW, Meadow JF, Connor TKO, Mhuireach G, Northcutt D, Kline J, *et al*. Architectural Design Drives the Biogeography of Indoor Bacterial Communities. 2014;9(1):1–10.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, Mendes C. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*. 2005;9:216–24.
- Klevens RM, Edwards JR, Richards CL Jr, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, Cardo DM. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep*. 2007;122(2):160–6.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:130.
- Lax S, Sangwan N, Smith D, Larsen P, Handley KM, Richardson M, *et al*. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci Transl Med*. 2017;6500(May):1–11.
- Lax S, Gilbert JA. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. *Trends Mol Med*. 2015;1–6.
- Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM, Handley KM, Scott NM, *et al*. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*. 2014 Aug 29;345(6200):1048–52.
- Lee MJ, Jang SJ, Li XM, Park G, Kook JK, Kim MJ, *et al*. Comparison of rpoB

gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):29–34.

Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, *et al*. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. *PLoS One*. 2016;11:e0151270.

Leonard DA, Bonomo RA, Powers RA. Class D β -lactamases: a reappraisal after five decades. *Acc Chem Res*. 2013;46(11):2407–15.

Levin AS, Gobara S, Mendes CMF, Cursino MR, Url S. Environmental Contamination by Multidrug - Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;22:717-20.

Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *NatMed*. 2004;10(12 Suppl):S122-9.

Longo F, Vuotto C, Donelli G. 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 37:119–27.

Lozupone CA, Stombaugh J, Gonzalez A, Ackermann G, Wendel D, Vasquez-Baeza Y. Meta-analysis studies of the human microbiota. *Genome Res*. 2013;23:1704–1714.

Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576–85.

Lucena A, Dalla Costa LM, Nogueira KS, Matos AP, Gales AC, Paganini MC, *et al*. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *J Hosp Infect*. 2014;87:234–240.

Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, *et al*. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–208.

Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology*. 2011;18(3):268–81.

Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirsch GM, Hold G, *et al*. The gut microbiota and host health : a new clinical frontier. 2016;330–9.

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, *et a*. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis

- of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1866–1871.
- Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(2):116–23.
- Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado ABMP, Barth AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infection.* 2009;37:474–476.
- Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control.* 2012;40:108–112.
- Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 2007;35:457–460.
- Martins HSI, Bomfim MRQ, França RO, Farias LM, Carvalho MAR, Serufo JC, Santos SG. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11:1465–1478.
- Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VBDC, Coelho-Souza T, *et al.* Imported and Intensive Care Unit-Born *Acinetobacter baumannii* Clonal Complexes: One-Year Prospective Cohort Study in Intensive Care Patients. *Microb Drug Resist.* 2013;19:216–23.
- Mcdonald D, Birmingham A, Knight R. Context and the human microbiome. *Microbiome.* 2015;1–8.
- Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:44–51.
- Minarini LA, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, Darini AL. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol.* 2008;56(6):587–91.
- Minarini LAR, Poirel L, Trevisani NAC, Darini ALC, Nordmann P. 2009. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:202–206.
- Morris EK, Caruso T, Fischer M, Hancock C, Obermaier E, Prati D, *et al.* Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol.* 2014;3514–24.

Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:396–401.

Munoz-Price LS, Arheart KL, Mills JP, Cleary T, Depascale D, Jimenez A, *et al*. Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am J Infect Control*. 2012;40(9):e245–8.

Munoz-Price LS, Namias N, Cleary T, Fajardo-Aquino Y, Depascale D, Arheart KL, Rivera JI, Doi Y. *Acinetobacter baumannii*: Association between Environmental Contamination of Patient Rooms and Occupant Status. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:517–520.

Munoz-Price LS. Controlling multidrug-resistant Gram-negative bacilli in your hospital: A transformational journey. *J Hosp Infect*. 2015;89(4):254–8.

Murni I, Duke T, Triasih R, Kinney S, Daley AJ, Soenarto Y. Prevention of nosocomial infections in developing countries, a systematic review. *Paediatr Int Child Health*. 2013;33(2):61–78.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, *et al*. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol*. 2011;162:393–404.

Neves FC, Clemente WT, Lincopan N, Paião ID, Neves PR, Romanelli RM, *et al*. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. *Brazilian J Infect Dis. Braz J Infect Dis*. 2016;20(6):556-563.

Nogueira K, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Reason ITM, Da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:87–92.

Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:162–169.

Oberauner L, Zachow C, Lackner S, Högenauer C, Smolle KH, Berg G. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing. *Sci Rep*. 2013;3:1413.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, *et al*. *vegan*: Community Ecology Package. R package version 2.0–8. 2013:1–264.

- Oliveira AC, Damasceno QS, Piscocya M, Nicoli JR. Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2012;40:186–187.
- Olmsted RN. Prevention by Design: Construction and Renovation of Health Care Facilities for Patient Safety and Infection Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(3):713-28.
- O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist*. 2014.
- O'Neill J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. *Rev Antimicrob Resist*. 2015b.
- O'Neill J. Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics. *Rev Antimicrob Resist*. 2015a.
- Otter JA, Yezli S, French GL. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(7):687–99.
- Otter JA, Yezli S, Perl TM, Barbut F, French GL. The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. *J Hosp Infect*. 2013b;83(1):1-13.
- Otter JA, Yezli S, Salkeld JAG, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control*. 2013a;41(5 SUPPL.):S6–11.
- Padoveze MC, Fortaleza CMCB. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2014;48(6):995–1001.
- Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36:860–862.
- Pagano M, Martins AF, Machado ABMP, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect*. 2013;41:330–333.
- Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277(1):91–104.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943-60.
- Patel JB. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. 2001;6(4):313–22.

- Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1039–1043.
- Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:265–268.
- Peleg MB, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. 2010;362(19):1804–13.
- Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:580–2.
- Perez LRR. *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J Chemother*. 2015;27:13-6.
- Perugini MR, Nomi SM, Lopes GK, Belei RA, van der Heijden IM, Mostachio AK, *et al*. Impact of the reduction of environmental and equipment contamination on vancomycin-resistant enterococcus rates. *Infection*. 2011 Dec;39(6):587-93.
- Pillonetto M, Arend LN, Faoro H, Espindula HRSD, Blom J, Smits THM, *et al*. Emended description of the genus *Phytobacter*, its type species *Phytobacter diazotrophicus* (Zhang 2008) and description of *Phytobacter ursingii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(1):176-184.
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:7592–7594.
- Pittet D, Allegranzi B, Storr J, Nejad SB, Dziekan G, Leotsakos A, *et al*. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J Hosp Infect*. 2008;68(4):285–92.
- Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, Nogueira MC. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis*. 2012;12:176.
- Prade SS, Oliveira ST, Rodriguez R, Nunes F, Netto EM, Félix JQ, *et al*. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospital terciário. *Rev Cont Inf Hosp*. 1995;2 (2):11-24.
- Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJU, Chebabo A, Pereira RMG, *et al*. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian J Med Biol Res*. 2015;48:174–177.

- Ramos T, Dedesko S, Siegel JA, Gilbert JA. Spatial and Temporal Variations in Indoor Environmental Conditions, Human Occupancy, and Operational Characteristics in a New Hospital Building. 2015;1–24.
- Raza MW, Kazi BM, Mustafa M, Gould FK. Developing countries have their own characteristic problems with infection control. *J Hosp Infect.* 2004;57(4):294–9.
- Rezzonico F, Smits THM, Duffy B. Misidentification slanders *Pantoea agglomerans* as a serial killer. *J Hosp Infect.* 2012;81(2):137–9.
- Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL da C, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2013;62:1721–1727.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008;197(8):1079–81.
- Rieger A, Mohr G, Vargas da Silva L, Fernando de Oliveira C, Pereira da Rocha M. Update on monitoring the spread of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. in South Brazil. *J Hosp Infect.* 2016;92:107–111.
- Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13:43.
- Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52(9):1138–43.
- Rozales P, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Barth AL, Zavascki AP, Lutz L, Falci DR. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil *Int J of Infect Dis.* 2014;25:79–81.
- Rubio FG, Oliveira VDC, Rangel RMC, Nogueira MCL, Almeida MTG. Trends in bacterial resistance in a tertiary university hospital over one decade. *Brazilian J Infect Dis.* 2013;17:480–482.
- Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25:57–61.
- Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):582.
- Scott RD. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. CDC, Centers for Control Disease and

Prevention, 2009.

Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceição M, Souza MJ, Marques EA, *et al.* Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. *Brazilian J Infect Dis.* 2013;17:640–646.

Sengupta M, Banerjee S, Das NK, Guchhait P, Misra S. Early onset Neonatal Septicaemia caused by *Pantoea agglomerans*. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10:DD01-DD02.

Shannon CE, Weaver W. *The Mathematical Theory of Communication.* Urbana, Illinois: University of Illinois, 1949.

Shimose LA, Masuda E, Sfeir M, Caban AB, Bueno MX, dePascale D, *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Concomitant Contamination of Air and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37:777-81.

Shogan BD, Smith DP, Packman AI, Kelley ST, Emily M. The Hospital Microbiome Project: Meeting report for the 2nd Hospital Microbiome Project, Chicago, USA, January 15(th), 2013. *Stand Genomic Sci.* 2013;8(3):571-9.

Shreiner AB1, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31(1):69-75.

Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature.* 1949;163:688.

Smith D, Alverdy J, An G, Coleman M, Garcia-houchins S, Green J, *et al.* The Hospital Microbiome Project: Meeting Report for the 1st Hospital Microbiome Project Workshop on sampling design and building science measurements. *Stand Genomic Sci.* 2013;8(1):112-7.

Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, NISC Comparative Sequencing Program, Henderson DK, *et al.* Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(148).

Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, Levi K, Weinstock G, Boswell TC, *et al.* Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. *Euro Surveill.* 2013;18(42). pii: 20611.

Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, *et al.* Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One.* 2015;10(2):1–22.

Tang P, Croxson MA, Hasan MR, Hsiao WWL, Hoang LM. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control.* 2017;45(2):170–9.

- Tavares CP, Pereira PS, Marques EA, Faria C, de Souza MPAH, de Almeida R, *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82:326–330.
- Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pitt CP, Barth AL. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAb1-blaOXA-23 genes in Latin America. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2739–2741.
- The Human Microbiome Project Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
- Tilg H, Adolph TE. Influence of the human intestinal microbiome on obesity and metabolic dysfunction. 2015;27(4):496–501.
- Tiwari S, Beriha SS. Pantoea species causing early onset neonatal sepsis: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9:188.
- Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: An urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect.* 2012;80:351–353.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(5):673–9.
- Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Mamizuka EM, Remeli GA, *et al.* High Prevalence of blaCTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of blaSHV-12. *Microb Drug Resist.* 2011;17:7–16.
- Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, *et al.* Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Brazilian J Infect Dis.* 2012;16:416–419.
- van Kleef E, Robotham J V, Jit M, Deeny SR, Edmunds WJ. Modelling the transmission of healthcare associated infections: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):294.
- Vasconcelos ATR, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, *et al.* The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83:382–385.
- Vasques MRG, Bello AR, Lamas CDC, Correa J, Pereira JAA. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011;15:28–33.

- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(3):470–82.
- Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One.* 2009;4(10):e7401.
- Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health. 2012;3(6):1–10.
- Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(4):338–44.
- Wellington EMH, Boxall ABA, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, *et al.* The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155–65.
- Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:452–454.
- WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance - a manual for developing national action plans, 2016.
- WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014.
- WHO. World Health Organization. Core components for infection prevention and control programmes - Assessment tools for IPC programmes, 2011b.
- WHO. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance, 2015.
- WHO. World Health Organization. Practical guidelines for infection control in health care facilities, 2004.
- WHO. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections, 2002.
- WHO. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide, 2011a.
- WHO. World Health Organization. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care, 2009.
- Whittaker, RH. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs.* 1960; 30:279-338.
- Wollheim C, Guerra IMF, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare APL, *et al.* Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.

in southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011;15:138-43.

Zander E1, Higgins PG, Fernández-González A, Seifert H. Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(2):88-9.

Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, *et al.* Health Care–Associated Infections. *JAMA Intern Med.* 2013;173(22):2039.

ANEXO 1
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, em especial aquelas que apresentam resistência ao tratamento com antimicrobianos. Pedimos a sua colaboração através da doação de amostras de seu material biológico e permissão para verificarmos a presença de bactérias nesse material. Se houver identificação de alguma bactéria patogênica ela poderá ser caracterizada através de métodos que irão 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 nas 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 se coloca à disposição para responder qualquer pergunta ou esclarecer dúvidas que porventura apareçam. Para isso, você poderá telefonar para o número (48) 3721-9712 ramal 214 ou (48) 9919-2240 e conversar com a Prof^a. Dra. Thaís C. M. Sincero ou para o número (48) 3369-0830 ou (48) 9608-5829 com a doutoranda Aline Fernanda Rodrigues Sereia (e-mail frs.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 Bairro Trindade, 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 aproximada de 15 minutos, para sabermos seu histórico de internações, infecções hospitalares que já tenha tido, hábitos de higienização, etc. Também precisaremos coletar amostras de alguns locais do seu corpo com um swab – uma haste de plástico flexível com posta 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 e rotineiro dentro do hospital, que não influenciam em suas atividades no 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 no futuro métodos mais eficientes de prevenção de infecções hospitalares, atuando no rastreamento contínuo e na rápida identificação da infecção, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Rubricas

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, 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 a relevância deste estudo e os 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 a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não me trará nenhum prejuízo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei 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 devo ser contatado para fornecer nova autorização para realização de novas pesquisas não mencionadas nesse 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. Thaís C. M. Sincero

Florianópolis, ___ de _____ de _____.

ANEXO 2
QUESTIONÁRIOS

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

QUESTIONÁRIO - PACIENTES

Projeto de Pesquisa:

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

Entrevistador: _____ **Assinatura:** _____

Data da entrevista e coleta: ____/____/____

Unidade onde o voluntário se encontra:

Emergência CRI CMI UTI CC

Nome do voluntário: _____

Nº do prontuário médico: _____

Leito: _____

ID amostras pct: _____ ID amostras leito: _____

Material biológico coletado:

Swab retal Swab mãos Swab nasal Swab oral

Outro, especifique _____

Dados pessoais do voluntário:

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone: _____

Res.: _____ Cel.: _____

Data 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 da internação: _____

Está internado no hospital há:

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 e quanto tempo?

<input type="checkbox"/> EMG	<input type="checkbox"/> 1 d	<input type="checkbox"/> 2-3 d	<input type="checkbox"/> 4-5 d	<input type="checkbox"/> 1-2 sem
	<input type="checkbox"/> 2-4 sem	<input type="checkbox"/> 1-2 m	<input type="checkbox"/> > 2 m	
<input type="checkbox"/> UTI	<input type="checkbox"/> 1 d	<input type="checkbox"/> 2-3 d	<input type="checkbox"/> 4-5 d	<input type="checkbox"/> 1-2 sem
	<input type="checkbox"/> 2-4 sem	<input type="checkbox"/> 1-2 m	<input type="checkbox"/> > 2 m	

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 e banheiro com paciente durante esse período?
 () Sim () Não

Histórico Médico:

Esteve internado em alguma unidade de saúde nos últimos 12 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 infecção:

() Pneumonia () Trato respiratório, não pneumonia

() Trato urinário () Sítio cirúrgico () Pele () Ferida

() Tecidos moles () Corrente sanguínea () Gastrointestinal

() Outro, especifique _____

() Data diagnóstico: _____ 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 julgue ser relevante e que não foi abordada nas perguntas realizadas?

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

QUESTIONÁRIO – PROFISSIONAIS DA SAÚDE

Projeto de Pesquisa:

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

Entrevistador: _____ **Assinatura:** _____

Data da entrevista e coleta: ____ / ____ / ____

Unidade onde o profissional trabalha:

() Emergência () CRI () CMI () UTI () CC

Nome do voluntário: _____

ID amostras: _____

Amostras de material biológico coletadas:

() Swab mãos () Swab jaleco () Swab celular

() 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 () Outra, 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 na outra(s) unidade(s) de saúde:

() 30h () 20h () Outra, especifique _____

Histórico Médico:

Nos últimos 12 meses desenvolveu algum tipo de infecção?

() Não () Sim

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

Tipo/sítio infecção:

() Pneumonia () Trato respiratório, não pneumonia

() Trato urinário () Pele () Orofaringe () Ouvido

() Sinusite () Gastrointestinal () Outro, especifique _____

() Data diagnóstico: _____

Antibioticoterapia: () Não () Sim. Antimicrobiano _____

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

Microrganismo identificado: () Não () Sim

- () *Klebsiella pneumoniae* () *Acinetobacter baumannii*
 () *Pseudomonas aeruginosa* () *Escherichia coli*
 () *Enterococcus faecium/faecalis* () *Staphylococcus aureus*
 () Outro, especifique: _____

Micro-organismo apresentava resistência aos antimicrobianos?

- () Sim () Não

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 julgue ser relevante e 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 realizo.
 () 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 realizo.
 () 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 realizo.
 () 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 realizo.

- 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 realizo.
 - 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 realizo.
 - 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 realizo.
 - Em todos os procedimentos que envolvem pacientes.
 - Em todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento.
 - Não utilizo.

Lavagem de mãos:

Foi instruído sobre os procedimentos de lavagem de mãos?

- Sim Não

Lavo as mãos:

- Antes Após todos os procedimentos que realizo.
- Antes Após todos os procedimentos que envolvem pacientes.
- Antes Após todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato.

Uso de álcool em gel desinfetante:

Foi instruído sobre os procedimentos de uso do álcool em gel?

- Sim Não

Utilizo o álcool em gel:

- Antes Após todos os procedimentos que realizo.
- Antes Após todos os procedimentos que envolvem pacientes.
- Antes 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 e desinfecção de mãos adequadamente?

- Não se aplica** Sim Não. Por que?
 Não receberam instruções adequadas
 Não aderem às instruções fornecidas

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

**Escolha no máximo 3 opções. Numere as opções escolhidas de 1 a 3, conforme a gravidade.*

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

Você realiza a limpeza de equipamentos e utensílios de leitos que recebem pacientes que estão sob precaução de contato ou isolamento?

- Sim Não

Foi instruído sobre os procedimentos e produtos utilizados para a limpeza e desinfecção 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 CCIH
 Instruções fornecidas pela chefia da unidade
 Instruções fornecidas por colegas de trabalho
 Informações coletadas em literatura científica ou 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 adequadas as suas condições de trabalho?

- Sim Não. Por que?

**Escolha no máximo 3 opções. Numere as opções escolhidas de 1 a 3, conforme a gravidade.*

- Não se aplica**
 Falta de programas de capacitação/reciclagem
 Demora na identificação de pacientes com infecção

- Falta de informações sobre pacientes em precaução de contato/isolamento
- Procedimentos preconizados para manuseio dos pacientes em precaução de contato/isolamento com são inadequados
- Falta de insumos e equipamentos
- Falta de estrutura física adequada
- Excesso de tarefas e responsabilidades
- Falta de profissionais na unidade
- Carga horária de trabalho excessiva
- Baixa remuneração

Há alguma informação da sua rotina profissional que julgue ser relevante e que não foi abordada nas perguntas realizadas?

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

QUESTIONÁRIO – AMBIENTE HOSPITALAR

Projeto de Pesquisa:

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

Entrevistador: _____ Assinatura

Data da entrevista e coleta: ___/___/_____

Entrevista realizada para a Unidade:

Emergência CRI CMI UTI CC

Nome do entrevistado: _____

Cargo desempenhado no Setor: _____

Dados da rotina dos profissionais da Unidade:

São instruídos a utilizar EPIs?

Luvas Não se aplica Sim, nos seguintes casos:

Em todos os procedimentos que realizo.

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 realizo.

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 realizo.

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 realizo.

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 realizo.

() 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 realizo.

() 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 realizo.

() 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: _____

Lavagem de mãos:

São instruídos sobre os procedimentos de lavagem de mãos?

() Sim () Não

Lavo as mãos:

() Antes () Após todos os procedimentos que realizo.

() Antes () Após todos os procedimentos que envolvem pacientes.

() Antes () Após todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato.

Uso de álcool em gel desinfetante:

São instruídos sobre os procedimentos de uso do álcool em gel?

() Sim () Não

Utilizo o álcool em gel:

() Antes () Após todos os procedimentos que realizo.

() Antes () Após todos os procedimentos que envolvem pacientes.

() Antes () Após todos os procedimentos que envolvem pacientes que estão sob precaução de contato.

Julga que a maioria dos profissionais da Unidade utilizam EPIs e realizam o procedimento de lavagem e desinfecção de mãos adequadamente?

() **Não se aplica** () Sim () Não. Por que?

Não receberam instruções adequadas

Não aderem às instruções fornecidas

Os profissionais da Unidade que NÃO utilizam EPIs e NÃO realizam o procedimento de lavagem e desinfecção de mãos de forma adequada pertencem, na maioria das vezes, à(s) seguinte(s) classe(s):

**Escolha no máximo 3 opções. Numere as opções escolhidas de 1 a 3, conforme a gravidade*

Não se aplica

Médico

Enfermeiro

Téc. Enfermagem

Fisioterapeuta

Farmacêutico

Psicólogo

Auxiliar de limpeza

Estudantes de medicina

Estudantes de enfermagem/técnico

Os profissionais da Unidade são instruídos sobre os procedimentos que podem auxiliar na diminuição das taxas de infecção hospitalar?

Sim Não Tipo de instrução:

Curso fornecido pela CCIH

Instruções fornecidas pela chefia da unidade

Instruções fornecidas por profissionais que trabalham há mais tempo no Setor

Informações coletadas em literatura científica ou meios de comunicação e que são repassadas aos profissionais da Unidade

Frequência da instrução: Semanal Mensal Bimestral

Trimestral Semestral Anual Outro: _____

Julga que essas informações são suficientes para que os profissionais da Unidade possam auxiliar no controle da taxa de infecção hospitalar?

Sim Não

Julga adequadas as condições de trabalho dos profissionais da Unidade? Sim Não. Por que?

**Escolha no máximo 3 opções. Numere as opções escolhidas de 1 a 3, conforme a gravidade.*

Não se aplica

Falta de programas de capacitação/reciclagem

Demora na identificação de pacientes com infecção

Falta de informações sobre pacientes em precaução de contato/isolamento

Procedimentos preconizados para manuseio dos pacientes em precaução de contato/isolamento com são inadequados

Falta de insumos e equipamentos

Falta de estrutura física adequada

Excesso de tarefas e responsabilidades

- Falta de profissionais na unidade
- Carga horária de trabalho excessiva
- Baixa remuneração

Dados da rotina de limpeza e desinfecção do ambiente:

Quais são os procedimentos para limpeza e desinfecção **CONCORRENTE?**

Quarto de paciente, procedimentos (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Troca de roupa de cama
- Limpeza do leito
- Limpeza dos equipamentos médicos
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto
- Limpeza das janelas
- Limpeza das portas
- Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha
- Limpeza das torneiras
- Limpeza do vaso sanitário
- Limpeza do box de banho
- Troca de cortinas

Quarto de paciente, produtos (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Água
- Sabão
- Água Sanitária, concentração _____
- Quaternário de amônio, concentração _____
- Álcool, concentração _____
- Limpa vidros
- Desinfetante de uso geral
- Outro, especifique: _____

Quarto de paciente, frequência (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- 2X dia
- 1X dia
- 3X semana
- 2X semana
- 1X semana

Sala cirúrgica, procedimentos (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Limpeza da mesa cirúrgica
- Limpeza do foco de luz
- Limpeza da mesa de materiais estéreis

- Limpeza dos equipamentos médicos
- Limpeza do carro de anestesia
- Limpeza das bancadas
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto

Sala cirúrgica, produtos (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Água
- Sabão
- Água Sanitária, concentração _____
- Quaternário de amônio, concentração _____
- Álcool, concentração _____
- Limpa vidros
- Desinfetante de uso geral
- Outro, especifique: _____

Sala cirúrgica, frequência (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Ao término da cirurgia
- Quando solicitado

Áreas comuns de trabalho (sala de medicamentos, sala de curativos, consultórios, expurgo, etc.), **procedimentos (CONCORRENTE):**

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Limpeza das bancadas e mesas
- Limpeza dos equipamentos médicos
- Limpeza de macas
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto
- Limpeza das janelas
- Limpeza das portas
- Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha
- Limpeza das torneiras
- Limpeza das pias

Áreas comuns de trabalho, produtos (CONCORRENTE):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Água
- Sabão
- Água Sanitária, concentração _____
- Quaternário de amônio, concentração _____
- Álcool, concentração _____
- Limpa vidros

Desinfetante de uso geral

Outro, especifique: _____

Áreas comuns de trabalho, frequência (CONCORRENTE):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

2X dia

1X dia

3X semana

2X semana

1X semana

quinzenalmente

Áreas de descanso e copa utilizados pelos profissionais da saúde, procedimentos (CONCORRENTE):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

Limpeza dos eletrodomésticos

Limpeza de móveis

Limpeza do chão

Limpeza das paredes

Limpeza do teto

Limpeza das janelas

Limpeza das portas

Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha

Limpeza das torneiras

Limpeza das pias

Áreas de descanso e copa, produtos (CONCORRENTE):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

Água

Sabão

Água Sanitária, concentração _____

Quaternário de amônio, concentração _____

Álcool, concentração _____

Limpa vidros

Desinfetante de uso geral

Outro, especifique: _____

Áreas de descanso e copa, frequência (CONCORRENTE):

2X dia

1X dia

3X semana

2X semana

1X semana

quinzenalmente

Quais são os procedimentos para limpeza e desinfecção **TERMINAL**?

Quarto de paciente, procedimentos (TERMINAL):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

Troca de roupa de cama

Limpeza do leito

- Limpeza dos equipamentos médicos
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto
- Limpeza das janelas
- Limpeza das portas
- Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha
- Limpeza das torneiras
- Limpeza do vaso sanitário
- Limpeza do box de banho
- Troca de cortinas

Quarto de paciente, produtos (TERMINAL):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
 - Água
 - Sabão
 - Água Sanitária, concentração _____
 - Quaternário de amônio, concentração _____
 - Álcool, concentração _____
 - Limpa vidros
 - Desinfetante de uso geral
 - Outro,
- especifique: _____

Quarto de paciente, frequência (TERMINAL):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- 2X dia
- 1X dia
- 3X semana
- 2X semana
- 1X semana

Sala cirúrgica, procedimentos (TERMINAL):

- Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos
- Limpeza da mesa cirúrgica
- Limpeza do foco de luz
- Limpeza da mesa de materiais estéreis
- Limpeza dos equipamentos médicos
- Limpeza do carro de anestesia
- Limpeza das bancadas
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto

Sala cirúrgica, produtos (CONCORRENTE):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

- Água
 Sabão
 Água Sanitária, concentração _____
 Quaternário de amônio, concentração _____
 Álcool, concentração _____
 Limpa vidros
 Desinfetante de uso geral
 Outro,

especifique: _____

Sala cirúrgica, frequência (TERMINAL):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

- Ao término da cirurgia
 Quando solicitado

Áreas comuns de trabalho (sala de medicamento, sala de curativos, consultórios, expurgo, etc.), procedimentos (TERMINAL):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

- Limpeza das bancadas e mesas
 Limpeza dos equipamentos médicos
 Limpeza de macas
 Limpeza de móveis
 Limpeza do chão
 Limpeza das paredes
 Limpeza do teto
 Limpeza das janelas
 Limpeza das portas
 Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha
 Limpeza das torneiras
 Limpeza das pias

Áreas comuns de trabalho, produtos (TERMINAL):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

- Água
 Sabão
 Água Sanitária, concentração _____
 Quaternário de amônio, concentração _____
 Álcool, concentração _____
 Limpa vidros
 Desinfetante de uso geral
 Outro,

especifique: _____

Áreas comuns de trabalho, frequência (TERMINAL):

Não se aplica Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

- 2X dia

- 1X dia
- 3X semana
- 2X semana
- 1X semana
- quinzenalmente

Áreas de descanso e copa utilizados pelos profissionais da saúde, procedimentos (TERMINAL):

- Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**
- Limpeza dos eletrodomésticos
- Limpeza de móveis
- Limpeza do chão
- Limpeza das paredes
- Limpeza do teto
- Limpeza das janelas
- Limpeza das portas
- Limpeza dos dispensadores de álcool, sabonete e toalha
- Limpeza das torneiras
- Limpeza das pias

Áreas de descanso e copa, produtos (TERMINAL):

- Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**
- Água
- Sabão
- Água Sanitária, concentração _____
- Quaternário de amônio, concentração _____
- Álcool, concentração _____
- Limpa vidros
- Desinfetante de uso geral
- Outro, especifique: _____

Áreas de descanso e copa, frequência (TERMINAL):

- Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**
- 2X dia
- 1X dia

Quem realiza a diluição dos produtos de limpeza?

- Auxiliares de limpeza Farmacêuticos
- Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**

Dados sobre o procedimento de admissão de pacientes no setor:

É realizado procedimento de rastreamento microbiológico para detectar o risco de presença de infecções e/ou colonização na admissão do paciente no setor?

- Não Sim
- Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**

Quais são os sítios pesquisados?

Swab retal Swab pele/ferida Sítio cirúrgico Urocultura LBA/ABA Outro, _____

É realizado procedimento de rastreamento microbiológico para detectar o risco de desenvolvimento de infecções durante a estadia do paciente no setor? Não

Sim **Não se aplica** **Não tenho conhecimento sobre esses**

procedimentos

Quais são os sítios pesquisados?

Swab retal Swab pele/ferida Sítio cirúrgico Urocultura LBA/ABA Outro, _____

Frequência:

1X Semana 2X semana 3X Semana Quando solicitado

É realizado algum procedimento de prevenção contra infecções para pacientes que serão submetidos a cirurgias ou procedimentos invasivos (exames, antibioticoterapia)?

Não Sim

Não se aplica **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**

O paciente é monitorado após sua alta do setor, com relação à ocorrência de infecções posteriores que podem estar relacionadas com a sua estadia no hospital?

Não Sim

Não se aplica **Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos**

O paciente que apresenta infecção hospitalar e seus acompanhantes são orientados a tomar medidas especiais de higiene pessoal e conduta?

Não Sim. Quais?

Lavagem de mãos

Desinfecção das mãos com álcool em gel

Uso de luvas

Uso de máscara

Uso de avental especial

Não se aplica

Não tenho conhecimento sobre esses procedimentos

Há alguma informação relativa à rotina dos profissionais, dos procedimentos de limpeza e desinfecção e dos procedimentos de admissão do paciente no setor que julgue ser relevante e que não foi abordada nas perguntas realizadas?

ANEXO 3
DESCRIÇÕES DOS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS

N	Unid. Hosp.	Local de coleta	Ponto de coleta	Detalhamento da coleta
1	EMG	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas.
2	EMG	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
3	EMG	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
4	EMG	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas.
5	EMG	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
6	EMG	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
7	EMG	PT-1	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
8	EMG	PT-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas.
9	EMG	PT-1	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
10	EMG	PT-2	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
11	EMG	PT-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
12	EMG	PT-2	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
13	EMG	PT-3	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
14	EMG	PT-3	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
15	EMG	PT-3	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
16	EMG	Leito 1	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
17	EMG	Leito 1	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates dos soros/medicamentos
18	EMG	Leito 2	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
19	EMG	Leito 2	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates dos soros/medicamentos
20	EMG	Leito 3	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como

				laterais e botões de controle.
21	EMG	Leito 3	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
22	EMG	Banheiro de PT	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
23	EMG	Posto de enfermagem	Bancada, Teclado e mouse do computador e telefone	Superfície da bancada na qual apoiam prontuários e demais documentos de trabalho. Teclas do computador e do mouse. Teclas de discagem do telefone e fone.
24	EMG	Sala de medicamentos	Dispensador de sabonete e torneira	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira.
25	EMG	Sala de medicamentos	Superfícies de alto contato	Bancada de trabalho e puxadores de armários de guarda de medicamentos
26	EMG	Sala de medicação	Cadeira do paciente	Superfície do encosto de cabeça, tronco, braços e pernas
27	EMG	Sala de medicação	Suporte de soro	Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
28	EMG	Área de prescrição médica	Teclado e mouse do computador	Teclas do computador e do mouse
29	EMG	Sala de procedimentos	Higienização de mãos	Superfícies das torneiras
30	EMG	Sala de procedimentos	Mesa cirúrgica	Toda extensão da mesa, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como as laterais.
31	EMG	Sala de curativos	Superfícies de alto contato	Bancada de trabalho e puxadores de armários de guarda de materiais
32	EMG	Consultório médico	Cama	Superfície da cama de atendimento do paciente (roupas de cama), em uso
33	EMG	Consultório médico	Teclado e mouse do computador	Teclas do computador e do mouse.
34	EMG	Consultório médico	Dispensador de sabonete e torneira	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira.
35	EMG	Recepção	Cadeiras de espera	Superfície do encontro do tronco
36	EMG	Copa	Superfícies de alto contato	Puxadores de eletrodomésticos
37	EMG	Sala de repouso da enfermagem	Superfícies de alto contato	Superfície da cama (roupas de cama), em uso
38	EMG	Equipamento de uso comum	Dispensador de álcool em gel	Válvula de pressão do dispensador de álcool em gel.
39	EMG	Equipamento de uso comum	Carro de medicamentos	Superfície superior de trabalho e puxadores de gavetas da guarda de medicamentos
40	CMI	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas

41	CMI	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
42	CMI	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
43	CMI	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
44	CMI	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
45	CMI	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
46	CMI	PT-1	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
47	CMI	PT-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
48	CMI	PT-1	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
49	CMI	PT-2	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
50	CMI	PT-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
51	CMI	PT-2	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
52	CMI	Leito 1	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga do Banheiro	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
53	CMI	Leito 1	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
54	CMI	Leito 1	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
55	CMI	Leito 2	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga do Banheiro	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
56	CMI	Leito 2	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
57	CMI	Leito 2	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
58	CMI	Posto de enfermagem	Bancada, teclado e mouse do computador e telefone	Superfície da bancada na qual apoiam prontuários e demais documentos de trabalho. Teclas do computador e do mouse. Teclas de discagem do telefone e fone.
59	CMI	Sala de medicamentos	Dispensador de sabonete e torneira	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira.
60	CMI	Sala de medicamentos	Superfícies de alto contato	Bancada de trabalho e puxadores de armários de guarda de

medicamentos				
61	CMI	Vestiário feminino	Armários	Puxadores dos armários de guarda dos pertences pessoais
62	CMI	Vestiário feminino	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga do banheiro	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
63	CMI	Copa	Superfícies de alto contato	Puxadores de eletrodomésticos
64	CMI	Sala de repouso da enfermagem	Superfícies de alto contato	Superfície da cama de atendimento do paciente (roupas de cama), em uso
65	CMI	Equipamento de uso comum	Dispensador de álcool em gel	Válvula de pressão do dispensador de álcool em gel
66	CMI	Equipamento de uso comum	Glicosímetro	Toda a superfície do equipamento, especialmente botões
67	CRI	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
68	CRI	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
69	CRI	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
70	CRI	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
71	CRI	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
72	CRI	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
73	CRI	PT-1	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
74	CRI	PT-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
75	CRI	PT-1	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
76	CRI	PT-2	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
77	CRI	PT-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
78	CRI	PT-2	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
79	CRI	Leito 1	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga do Banheiro	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
80	CRI	Leito 1	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
81	CRI	Leito 1	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
82	CRI	Leito 2	Dispensador de sabão, torneira e	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da

			válvula de descarga do Banheiro	torneira. Válvula de acionamento da descarga
83	CRI	Leito 2	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
84	CRI	Leito 2	Régua de gases e suporte de soro	Manipulares da régua de gases. Região central do suporte de soro e engates do soro/medicamentos
85	CRI	Posto de enfermagem	Bancada, Teclado e mouse do computador e telefone	Superfície da bancada na qual apoiam prontuários e demais documentos de trabalho. Teclas do computador e do mouse. Teclas de discagem do telefone e fone.
86	CRI	Sala de medicamentos	Dispensador de sabonete e torneira	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira.
87	CRI	Sala de medicamentos	Superfícies de alto contato	Bancada de trabalho e puxadores de armários de guarda de medicamentos
88	CRI	Sala de curativos	Superfícies de alto contato	puxadores de armários de guarda de materiais
89	CRI	Copa	Superfícies de alto contato	Puxadores de eletrodomésticos
90	CRI	Sala de repouso de PS	Superfícies de alto contato	Superfície da cama de atendimento do paciente (roupas de cama), em uso
91	CRI	Equipamento de uso comum	Dispensador de álcool em gel	Válvula de pressão do dispensador de álcool em gel
92	CRI	Equipamento de uso comum	Glicosímetro	Toda a superfície do equipamento, especialmente botões
93	CC	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
94	CC	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
95	CC	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
96	CC	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
97	CC	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
98	CC	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
99	CC	Sala de recuperação pós-anestésica	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
100	CC	Sala de recuperação pós-anestésica	Equipamentos médicos	Botões da bomba de infusão e do monitor
101	CC	Sala de recuperação pós-anestésica	Superfícies de alto contato	Superfície da bancada na qual apoiam materiais e documentos de trabalho. Puxadores dos armários de guarda de materiais e medicamentos
102	CC	Sala cirúrgica em uso	Mesa cirúrgica	Toda extensão da mesa, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como as

				laterais.
103	CC	Sala cirúrgica em uso	Carro de anestesia - superfícies de alto contato	Superfície superior de trabalho, válvulas de gases e puxadores de gavetas da guarda de medicamentos
104	CC	Sala cirúrgica em uso	Laringoscópio	Toda superfície de laringoscópio pornto para uso
105	CC	Sala cirúrgica em uso	Bandeja de anestésicos injetáveis	Superfície da bandeja de apoio dos anestésicos injetáveis, durante seu uso
106	CC	Sala cirúrgica limpa	Mesa cirúrgica	Toda extensão da mesa, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como as laterais.
107	CC	Sala cirúrgica limpa	Foco	Superfícies do foco utilizadas para ajuste de posição
108	CC	Sala cirúrgica limpa	Bomba de infusão	Botões da bomba de infusão
109	CC	Sala cirúrgica limpa	Bisturi elétrico	Botões do bisturi elétrico
110	CC	Vestiário feminino	Armários	Puxadores dos armários de guarda dos pertences pessoais
111	CC	Vestiário feminino	Dispensador de sabonete e torneira	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira.
112	CC	Sala de repouso médico	Superfícies de alto contato	Superfície da cama de atendimento do paciente (roupas de cama), em uso
113	CC	Copa	Superfícies de alto contato	Puxadores de eletrodomésticos
114	CC	Equipamento de uso comum	Teclado e mouse do computador da enfermagem	Teclas do computador e do mouse
115	CC	Equipamento de uso comum	Maca	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e colchão.
116	CC	Equipamento de uso comum	Dispensador de álcool em gel	Válvula de pressão do dispensador de álcool em gel
117	UTI-A	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
118	UTI-A	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
119	UTI-A	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
120	UTI-A	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
121	UTI-A	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
122	UTI-A	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
123	UTI-A	PT-1	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
124	UTI-A	PT-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
125	UTI-A	PT-1	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios

(ambas as narinas)				
126	UTI-A	PT-2	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfínter anal e realização de movimentos giratórios
127	UTI-A	PT-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
128	UTI-A	PT-2	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
129	UTI-A	Leito 1	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
130	UTI-A	Leito 1	Bomba de infusão	Botões da bomba de infusão
131	UTI-A	Leito 1	Monitor	Botões e tela do monitor
132	UTI-A	Leito 1	Cortina	Superfícies laterais, utilizadas para abertura e fechamento
133	UTI-A	Leito 2	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
134	UTI-A	Leito 2	Mesa de utilidades	Superfície de apoio para objetos pessoais do paciente e puxadores das gavetas de guarda de materiais
135	UTI-A	Leito 2	Parede de suporte para vestimenta privativa de isolamento de contato	Superfície da parede que contém o gancho para guarda da vestimenta privativa em uso (guardada sempre do avesso)
136	UTI-A	Leito 2	Termômetro	Extensão do fio
137	UTI-A	Posto de enfermagem	Bancada, Teclado e mouse do computador e telefone	Superfície da bancada na qual apoiam prontuários e demais documentos de trabalho. Teclas do computador e do mouse. Teclas de discagem do telefone e fone.
138	UTI-A	Posto de enfermagem	Prancheta de prontuário médico	Superfície traseira e prendedor das pranchetas que contém os prontuários médicos
139	UTI-A	Área de prescrição médica	Teclado e mouse do computador	Teclas do computador e do mouse.
140	UTI-A	Sala de equipamentos	Equipamentos médicos higienizados	Bombas de infusão higienizadas, prontas para usos
141	UTI-A	Vestiário feminino	Armários	Puxadores dos armários de guarda dos pertences pessoais
142	UTI-A	Vestiário feminino	Dispensador de sabão, torneira e válvula de descarga do Banheiro	Válvula de pressão do dispensador de sabão. Válvula de abertura da torneira. Válvula de acionamento da descarga
143	UTI-A	Sala de utilidades	Superfícies de alto contato	Bancada de trabalho e puxadores de armários de guarda de materiais
144	UTI-A	Sala de utilidades	Secadora	Interior da secadora
145	UTI-A	Sala de	Superfícies de alto	Superfície da cama de atendimento

		repouso médico	contato	do paciente (roupas de cama), em uso
146	UTI-A	Sala de repouso da enfermagem	Superfícies de alto contato	Superfície da cama de atendimento do paciente (roupas de cama), em uso
147	UTI-A	Copa	Superfícies de alto contato	Puxadores de eletrodomésticos
148	UTI-B	PS-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
149	UTI-B	PS-1	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
150	UTI-B	PS-1	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
151	UTI-B	PS-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
152	UTI-B	PS-2	Vestimenta	Jaleco ou roupa privativa da unidade
153	UTI-B	PS-2	Telefone celular	Teclas, tela e parte traseira
154	UTI-B	PT-1	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
155	UTI-B	PT-1	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
156	UTI-B	PT-1	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
157	UTI-B	PT-2	Reto	Introdução do <i>swab</i> cerca de 2cm a partir do esfíncter anal e realização de movimentos giratórios
158	UTI-B	PT-2	Mãos	Dorso, palma, espaços interdigitais e unhas
159	UTI-B	PT-2	Narinas	Introdução do <i>swab</i> na narina realização de movimentos giratórios (ambas as narinas)
160	UTI-B	Leito 1	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
161	UTI-B	Leito 1	Bomba de infusão	Botões da bomba de infusão
162	UTI-B	Leito 1	Monitor	Botões e tela do monitor
163	UTI-B	Leito 1	Cortina	Superfícies laterais, utilizadas para abertura e fechamento
164	UTI-B	Leito 2	Grades da cama	Toda extensão das grades, especialmente as partes mais tocadas para manipulação, como laterais e botões de controle.
165	UTI-B	Leito 2	Mesa de utilidades	Superfície de apoio para objetos pessoais do paciente e puxadores das gavetas de guarda de materiais
166	UTI-B	Leito 2	Parede de suporte para vestimenta privativa de isolamento de contato	Superfície da parede que contém o gancho para guarda da vestimenta primitiva em uso (guardada sempre do avesso)

167	UTI-B	Leito 2	Termômetro	Extensão do fio
168	UTI-B	Posto de enfermagem	Bancada, Teclado e mouse do computador e telefone	Superfície da bancada na qual apoiam prontuários e demais documentos de trabalho. Teclas do computador e do mouse. Teclas de discagem do telefone e fone.
169	UTI-B	Posto de enfermagem	Refrigerador	Puxador de abertura e superfície lateral, também utilizada para abertura
170	UTI-B	Area de prescrição médica	Teclado e mouse do computador	Teclas do computador e do mouse.
171	UTI-B	Equipamento de uso comum	Dispensador de álcool em gel	Válvula de pressão do dispensador de álcool em gel
172	UTI-B	Equipamento de uso comum	Carro de roupas de cama limpas	Superfície do carro que transporta e distribui as roupas de cama limpas, prontas para uso
173	UTI-B	Equipamento de uso comum	Glicosímetro	Toda a superfície do equipamento, especialmente botões
174	UTI-B	Equipamento de uso comum	Cufômetro	Toda a superfície do equipamento
175	UTI-B	Equipamento de uso comum	Carro de banho portátil	Botões de acionamento e ajuste
176	UTI-B	Equipamento de uso comum	Carro de parada cardíaca	Botões de acionamento e ajuste e pegadores das pás
177	UTI-B	Equipamento de uso comum	Equipamento de Raio-X portátil	Botões de acionamento e ajuste
178	UTI-B	Equipamento de uso comum	Equipamento de ultrassonografia	Botões de acionamento e ajuste
179	UTI-B	Equipamento de uso comum	Prancha de transferência de pacientes	Toda a superfície da prancha
180	UTI-B	Equipamento de uso comum	Cadeira de fisioterapia	Superfície do encosto de cabeça, tronco, braços e pernas

PT: pacientes; PS: profissionais da saúde; EMG: emergência; CMI: clínica médica I; CRI: clínica cirúrgica I; CC: centro cirúrgico

UTI-A: unidade de terapia intensiva A; UTI-B: unidade de terapia intensiva B

ANEXO 4
LISTA DE ESPÉCIES ASSOCIADAS ÀS IRAS

A seguir são apresentadas as espécies e gêneros bacterianos que compõem o filtro IRAS, presente na plataforma *on line* Neobiome (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil), que foi estabelecido de acordo dados de revisão de literatura e utilizado no presente trabalho. No filtro constam espécies bacterianas que já foram implicadas em IRAS, mesmo que em menor frequência.

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>phagocytophilum</i>	<i>violaceum</i>
<i>denitrificans</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Chryseobacterium gleum</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chryseobacterium</i>
<i>xylooxidans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>indologenes</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Acinetobacter baylyi</i>	<i>Bartonella henselae</i>	<i>amalonaticus</i>
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	<i>Bartonella quintana</i>	<i>Citrobacter braakii</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bordetella</i>	<i>Citrobacter farmeri</i>
<i>calcoaceticus</i>	<i>bronchiseptica</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bordetella hinzii</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>gyllenbergii</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bordetella trematum</i>	<i>Citrobacter werkmanii</i>
<i>haemolyticus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Citrobacter youngae</i>
<i>Acinetobacter indicus</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Clostridium baratii</i>
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>Acinetobacter junii</i>	<i>vesicularis</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Clostridium disporicum</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Brucella canis</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>nosocomialis</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Acinetobacter parvus</i>	<i>Brucella suis</i>	<i>Clostridium sordellii</i>
<i>Acinetobacter pittii</i>	<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>radioresistens</i>	<i>cenocepacia</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Acinetobacter schindleri</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>diphtheriae</i>
<i>Acinetobacter soli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
<i>Acinetobacter towneri</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>
<i>Acinetobacter ursingii</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Cupriavidus pauculus</i>
<i>Actinobacillus ureae</i>	<i>pseudomallei</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Dermaococcus</i>
<i>Aerococcus urinae</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>nishinomiyaensis</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Edwardsiella hoshinae</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Cedecea davisae</i>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Elizabethkingia</i>
<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>meningoseptica</i>
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>Alloiococcus otitis</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Enterococcus avium</i>

<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Paracoccus yeei</i>
<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>
<i>Enterococcus columbae</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Pasteurella canis</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Pasteurella dagmatis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Pasteurella testudinis</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Escherichia albertii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Proteus hauseri</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Facklamia hominis</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Micrococcus lylae</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Gemella bergeri</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Providencia rustigianii</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Providencia vermicola</i>
<i>Gemella sanguinis</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Globicatella sanguinis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Granulicatella elegans</i>	<i>Mycoplasma penetrans</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
<i>Grimontia hollisae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas oryziphobans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria animaloris</i>	<i>Pseudomonas otitidis</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Helcococcus kunzii</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
<i>Khuyvera ascorbata</i>	<i>Oligella ureolytica</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Khuyvera cryocrescens</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	
<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	
<i>Kocuria rosea</i>	<i>Pantoea septica</i>	
<i>Kocuria varians</i>	<i>Pantoea stewartii</i>	
<i>Kytococcus sedentarius</i>		

<i>Raoultella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus ovis</i>
<i>ornithinolytica</i>	<i>haemolyticus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>parasanguinis</i>
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteurianus</i>
<i>Roseomonas gilardii</i>	<i>intermedius</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>plurimalium</i>
<i>Rothia mucilaginoso</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Staphylococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
<i>Serratia ficaria</i>	<i>lugdunensis</i>	<i>Streptococcus porcinus</i>
<i>Serratia fonticola</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>pettenkoferi</i>	<i>pseudoporcinus</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Serratia odorifera</i>	<i>pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>ssp. thermophilus</i>
<i>Shewanella algae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>schleiferi</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	<i>thoraltensis</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>multivorum</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>vestibularis</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>maltoiphilia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>spiritivorum</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Vagococcus fluvialis</i>
<i>thalpophilum</i>	<i>alactolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Sphingomonas</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>paucimobilis</i>	<i>Streptococcus canis</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus downei</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>auricularis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Yersinia aldovae</i>
<i>Staphylococcus caprae</i>	<i>hyointestinalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>
<i>chromogenes</i>	<i>infantarius</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>epidermidis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>massiliensis</i>	<i>pseudotuberculosis</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
<i>gallinarum</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Yokenella regensburgae</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>	