

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE SUPERFÍCIES
INANIMADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE MANAUS

DEBORAH DA SILVA BRAZ

MANAUS – AMAZONAS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DEBORAH DA SILVA BRAZ

RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE SUPERFÍCIES
INANIMADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE MANAUS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito final
de avaliação para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães

MANAUS – AMAZONAS
2016

Braz, Deborah da Silva
B827r Resistência aos Carbapenêmicos em Enterobactérias: Avaliação
de Superfícies Inanimadas em Hospitais da Cidade de Manaus /
Deborah da Silva Braz. 2016
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Enterobactérias. 2. Resistência Bacteriana. 3. Beta-lactâmicos.
4. Manaus. I. Magalhães, Karen Regina Carim da Costa II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEBORAH DA SILVA BRAZ

RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE SUPERFÍCIES
INANIMADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE MANAUS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito final
de avaliação para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovado em 31 de agosto de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Takeshi Matsuura

Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Marias Deane

DEDICATÓRIA

À minha rainha Deuza Maria, fonte de fortaleza,
aconchego, que comigo sonhou tantos sonhos e
conquistas e ao meu pai Delmar (*in memoriam*) que me
acompanha em todas as etapas de minha vida, onde quer
que esteja.

Ao Francisco, da vida, entre tantos, o melhor presente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por ser sempre o centro da busca de forças, mesmo em momentos de dificuldade e desânimo, permitindo-me a concretização de mais uma etapa importante na minha vida.

A minha mãe Deuza Herculano, por ter sido mãe, pai, amiga, conselheira e que tanto não mediu esforços para que me conduzisse neste caminho. Agradeço pela sua incansável luta, amor e por tantas vezes se ajoelhar para fazer preces quando eu mais preciso. Te amo incondicionalmente!

Ao meu pai Delmar Braz, no qual sei o quanto gostaria de estar presente em vida para prestigiar um momento tão importante para minha formação. Apesar de sua ausência em corpo, tenho certeza que estás sempre presente em espírito junto a mim, aonde quer que eu vá. Saudades eternas.

Ao meu querido amado esposo Francisco, meu melhor amigo, o melhor presente que a vida poderia me conceder. Agradeço por sempre me fazer rir, enxugar minhas lágrimas, me manter firme e forte e acima de tudo, acreditar em meu potencial. Amo você com todas as suas características.

Aos meus tios, avós e primos. Obrigada pela compreensão dos momentos de ausência e por sempre me dizerem que eu chegaria longe. Estou chegando lá. Amo cada um de vocês.

À Profa. Karen Regina pelo dom de orientar, conduzir, lecionar, e por participar nas escolhas que decidi para minha profissão. Minha imensa gratidão, por toda dedicação, carinho e atenção.

Aos anjos da minha vida, Aimée, Alana, Bárbara Ellen, Claudia, Gabrielle, Juliana, Marla e Swami, as melhores amigas que eu poderia ter. Agradeço por sempre participarem de todos os momentos importantes da minha trajetória e por tantos puxões de orelha. São 10 anos de amizade e com certeza envelheceremos juntas. Amo vocês.

Aos amigos de faculdade Bárbara Salgado, Ana Jacqueline e Hygor Halysson, em que nossa amizade vai muito mais além que uma sala de aula. O que a faculdade uniu nada nos separa. Amo vocês para toda a vida.

Agradeço ainda aos colegas técnicos da FCF-UFAM, em especial à querida amiga Giane Alves pelos momentos de descontração, tornando o ambiente de trabalho mais prazeroso.

À Samantha Tuffic por ter sido uma das participantes deste trabalho, menina doce que tem uma trajetória promissora na microbiologia. Agradeço por ter feito parte dos meus momentos de bancada e por ter solidariamente contribuído diversas vezes.

Às professoras Raquel Bonelli, Renata Picão e em especial à professora Beatriz Meurer do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto Paulo de Goés – UFRJ, que me acolheram incondicionalmente no momento em que mais precisei no meu trabalho. Agradeço pela disponibilização de espaço e acima de tudo, seus conhecimentos e valores.

Aos colegas do laboratório L IMM, em especial à Eloíza Campana, a qual foi peça chave e fundamento do meu trabalho. Obrigada por ter disponibilizado de tempo da sua vida corrida para dedicação à minha passagem no laboratório, e por aturar tantos questionamentos sem nunca medir esforços para ajudar.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, com todo o seu corpo docente e técnico, proporcionando o conhecimento que até aqui adquiri, e por serem os principais envolvidos na minha construção profissional e pessoal.

*“Cada sonho que você deixa para trás é
um pedaço do seu futuro que deixa de
existir”*

Steve Jobs

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde são responsáveis em suma pelo comprometimento imunológico, físico e mental de pacientes hospitalizados. Entre tantas formas de aquisição de infecções nosocomiais, as superfícies inanimadas hospitalares são apontadas como responsáveis por transmissão cruzada de micro-organismos presentes nessas superfícies a pacientes hospitalizados. Muitos desses agentes produzem mecanismos responsáveis pela resistência a uma infinidade de antibióticos. As Enterobactérias são as bactérias mais comuns em infecções hospitalares, com produção de ESβL contra beta-lactâmicos e carbapenemases contra carbapenêmicos. Com o intuito de avaliar a presença de Enterobactérias em superfícies inanimadas hospitalares, bem como seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos, possível produção de enzimas de resistência, este estudo foi realizado em superfícies inanimadas de dois hospitais da cidade de Manaus-AM: HUGV e ICAM. As superfícies avaliadas foram torneiras de enfermarias e estruturas laterais de leitos e colchões, com isolamento e identificação das amostras recuperada dessas superfícies, avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, testes fenotípicos para detecção de produção de enzima, e caracterização molecular para avaliação das enzimas produzidas. Como resultados, foram recuperados 23 isolados de Enterobactérias do HUGV e 33 do ICAM, com prevalência de espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*. As amostras apresentaram resistência a penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, além de outras classes, e sensibilidade aos carbapenêmicos. Quatorze amostras foram triadas como produtoras de ESβL e uma amostra apresentou perfil de resistência a carbapenêmicos, confirmado por métodos moleculares. As enzimas mais encontradas foram TEM, SHV e CTX-M-1/2. Um isolado de *K. pneumoniae* foi identificado como produtor de KPC. Três amostras do HUGV e 2 amostras do ICAM apresentaram similaridade genética de 100% no RAPD. Os achados deste estudo contribuem para a epidemiologia local, ressaltando a importância de implantação de sistemas de controle de micro-organismos no ambiente inanimado e a implementação de melhores condições de higiene e sanitização. A identificação precoce de cepas produtoras de β-lactamases/carbapenemases tanto em infecções clínicas e/ou no estado de colonização é imprescindível para prevenir dificuldades ou impossibilidade de tratar infecções, dado a redução do aparecimento de novos antimicrobianos no mercado.

Palavras-chave: Enterobactérias, resistência bacteriana, Manaus.

ABSTRACT

The infections related with health assistance are responsible in resume for the hospitalized patients' immunological, physical and mental commitment. In all the ways of nosocomial infections acquisition, the inanimate surfaces are indicated as responsible by the microorganism intersected contaminations presents at these surfaces to these patients. The majority of these agents produce mechanisms responsible by the resistance with a large quantity of antibiotics. The enterobacterias are the most common in hospital infections, with the production of ES β L against the β -lactaminics and carbapenamasis against carbapenemics. With the goal of evaluate the presence of enterobacterias in hostpital surfaces, as well the profile of resistance to antibiotics and possible production of resistance enzyme, this project were realized in hospital inanimate surfaces of two local hospitals: HUGV and ICAM. The evaluated surfaces were infirmary's sinks and bed and mattress' lateral structure, with isolation and identification of the recovered samples from these surfaces, antibiotics sensibility profile evaluation, phenotypic tests to detect the production of the enzyme and molecular characterization to evaluate the enzymes produced. As results, were recovered 23 isolated of enterobacteria at HUGV and 33 at ICAM, with the prevalence of species of *Enterobacter* and *Klebsiella*. The samples showed resistance against first generation penicillin and cephalosporin, over well other classes, and sensibility to carbapenemics. Fourteen samples were classified as producers of ES β L and one sample presented a resistance profile to carbapenemics, confirmed by molecular methods. The most founded enzymes were TEM, SHV and CTX-M-1/2. One isolated of *k. pneumoniae* were identified as KPC producer. Three samples from HUGV and two samples from ICAM showed 100% of similarity. The results of this project contribute with the local epidemiology, emphasizing the importance of the implementation of better hygiene and sanitization conditions. The premature identification of the β -lactamases/carbapenemases producers not only in clinical infections, but also in colonization state are vital to prevent difficulty and impossibility to treat infections, in consequence of the reduction of antibiotics release in the market.

Keywords: Enterobacteria, bacterian resistance, Manaus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Superfícies inanimadas de enfermarias hospitalares mais suscetíveis à contaminação.....	24
Figura 2: Comparação da estrutura e das paredes celulares de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.	26
Figura 3 Mecanismo geral de resistência de Gram-negativos.	28
Figura 4 Estrutura elementar dos quatro grupos de β -lactâmicos e ácido clavulânico.....	31
Figura 5: Esquema de coleta de superfícies inanimadas hospitalares, conforme descrito por Hedin e colaboradores (2010).....	43
Figura 6: Fluxograma para triagem e identificação dos Gram-negativos	46
Figura 7: Placa modelo de disco aproximação utilizada para a detecção fenotípica da produção de ES β L.	50
Figura 8: Resultado representativo do teste de Carba NP e possíveis padrões de interpretação.	51
Figura 9: Teste fenotípico por disco aproximação para detecção de ES β L das amostras do HUGV.....	73
Figura 10: Teste fenotípico por disco aproximação para detecção de ES β L das amostras do ICAM.....	74
Figura 11: Detecção fenotípica de carbapenemases pelo teste de Carba NP.	77
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da reação de PCR	84
Figura 13: Dendrograma da similaridade genética entre os isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos pela análise simultânea dos primers 1247 e 1283.....	85
Figura 14: Dendrograma da similaridade genética entre os isolados de <i>Enterobacter</i> obtidos pela análise simultânea dos primers 1247 e 1283.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Relação de distribuição de Gram-negativos nas superfícies inanimadas dos hospitais HUGV e ICAM.....	62
Gráfico 2: Relação de espécies de Enterobactérias recuperadas do HUGV.....	64
Gráfico 3: Relação de espécies de Enterobactérias recuperadas do ICAM.....	64
Gráfico 4: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias recuperadas do HUGV.....	69
Gráfico 5: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias recuperadas do ICAM.....	69
Gráfico 6: Distribuição de enzimas detectadas nos hospitais estudados.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das principais β -lactamases encontradas em Enterobactérias.	40
Tabela 2: Cepas controle utilizadas nas reações de PCR (Laboratório ALERTA)	53
Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos e condições de termociclagem utilizadas para a amplificação dos genes pesquisados.....	56
Tabela 4: Proporção de leitos e torneiras coletadas de acordo com cálculos do programa OpenEpi. x índice de positividade	60
Tabela 5: Distribuição de Enterobactérias recuperadas de superfícies inanimadas do HUGV	65
Tabela 6: Distribuição de Enterobactérias recuperadas de superfícies inanimadas do ICAM .	66
Tabela 7: Relação de isolados positivos em disco aproximação, sítio de recuperação e perfil de resistência a antimicrobianos do HUGV.	72
Tabela 8: Relação de isolados positivos em disco aproximação, sítio de recuperação e perfil de resistência a antimicrobianos do ICAM.....	74
Tabela 9: Perfil molecular dos isolados identificados como produtores de β -lactamases e carbapenemases pelos métodos fenotípicos	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpC - Cefalosporinas
ATCC - *American Type Culture Collection*
BGN-NF - Bacilos Gram-negativos Não Fermentadores
BHI - *Brain Heart Infusion*
CRE - *Carbapenem-resistant enterobacteriaceae*
CTI - Centro de Terapia Intensiva
CTX-M - Cefotaximase
EDTA - Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
ES β L - *Extended Spectrum β -Lactamase*
GES - Guiana Extended Spectrum
GIM - German Imipenemase
HUGV - Hospital Universitário Getúlio Vargas
ICAM - Instituto da Criança do Amazonas
IMP - Imipenemase
KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
MALDI-TOF-MS - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*
MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
M β L - Metallo- β -lactamase
NDM - New Delhi metallo-beta-lactamase
pAMPC - cefalosporinas plasmidiais
PBP - Proteína de ligação À penicilina
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*
SHV - Sulfhydryl-Variable β -Lactamase
SIM - Seul Imipenemase
SPM - São Paulo Metallo- β -Lactamase
TEM - Temoniera β -Lactamase
TSI - *Trypticase Soy Agar*
VIM - Verona Imipenemase
VRE - *Vancomycin-Resistant Enterococci*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Micro-organismos em superfícies inanimadas.....	22
3.2 Bacilos Gram-negativos e membros da família <i>Enterobacteriaceae</i> : aspectos gerais e mecanismos de resistência.....	25
3.3 β -lactâmicos e carbapenêmicos	29
3.4 β -lactamases	32
3.4.1 β -lactamases Classe A	33
3.4.2 β -lactamases Classe C	35
3.4.3 Carbapenemases classe B	36
3.4.4 β -lactamases classe D	37
3.4.5 Carbapenemases classe A	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Desenho do estudo	42
4.2 Aspectos éticos.....	42
4.3 Tipo de amostra e coleta.....	42
4.4 Isolamento e identificação das Enterobactérias	45
4.5 Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	48
4.6 Detecção fenotípica de ES β L por disco aproximação.....	49
4.7 Teste fenotípico de carbapenemases CARBA NP	50
4.8 Identificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e multiplex...52	
4.9 Caracterização Molecular	58
4.10 Análise Estatística	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 Tamanho da amostra e perfil epidemiológico dos hospitais	60
5.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	68
5.3 Avaliação fenotípica de produção de ES β L e carbapenemases.....	72
5.4 Identificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e multiplex..78	

5.5 Caracterização Molecular	84
6. CONCLUSÃO	87
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9. ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde, também conhecidas como infecções nosocomiais, são declaradas como o maior desafio para a segurança de pacientes hospitalizados, principalmente quando se diz respeito ao prolongado tempo de internação, refletindo na instabilidade do quadro clínico desses pacientes (PELEG; HOOPER, 2010). Essas infecções repercutem nos custos hospitalares, no uso dos antimicrobianos e favorecem o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006).

De um âmbito geral, a maior parte das infecções relacionadas à assistência à saúde provém de infecções cruzadas, incluindo mãos de profissionais contaminadas em manipulações com o paciente, micro-organismos em superfícies inanimadas como torneiras, materiais de limpeza, leitos e poltronas (DREES, 2008). Outras potenciais formas de contaminação associam-se a dispositivos médicos invasivos e procedimentos cirúrgicos. Estas vias foram identificadas como bases de modelos para interromper as transmissões (OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011; WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013), visando melhor compreensão das recomendações de controle das infecções relacionadas à assistência à saúde, definição de políticas de controle e aproximação dos profissionais de saúde com o tema (LEMMEN et al., 2004).

Uma vez que existem evidências consideráveis comprovando a aquisição de patógenos nosocomiais e sua presença em superfícies hospitalares, torna-se fundamental a avaliação dos micro-organismos associados a estas formas de contaminação. No decorrer da última década, a evidência científica substancial tem comprovado que a contaminação de superfícies ambientais em quartos de hospitais possui um considerável papel na transmissão de vários agentes patogênicos importantes de saúde, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a

meticilina (MRSA), *Enterococcus spp.* resistente à vancomicina (VRE), *Clostridium difficile* e *Acinetobacter spp.* (BOYCE, 2007; OTTER et al., 2011).

Apesar de vários estudos descreverem a relação da presença de bactérias Gram-positivas contaminando objetos e infecções nosocomiais, dentre os micro-organismos mais envolvidos nas infecções relacionados à assistência hospitalar destacam-se os Bacilos Gram-negativos Não-Fermentadores (BGN-NF) e membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes patógenos podem sobreviver por vários meses, necessitando apenas de um ambiente úmido, causando infecção ao entrarem no tecido do hospedeiro através da ruptura da barreira cutânea ou por inoculação traumática, associadas a agulhas na infusão intravenosa de soro, instalação de cateteres vasculares, urinários, neurocirúrgicos, entre outras formas de disseminação (CORRÊA et al., 2013).

Os dois principais caminhos pelos quais a medicina moderna salva vidas são através do tratamento com antimicrobianos em doenças infecciosas e o emprego de procedimentos médicos e cirúrgicos também sob proteção e profilaxia com antibióticos (NATHAN; CARS, 2014). Por outro lado, a rápida evolução e propagação de bactérias resistentes a antimicrobianos, em conjunto com a deficiência do desenvolvimento e descoberta de novas substâncias ativas, afetam seriamente o futuro da terapia de infecções bacterianas (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014). Há 10 anos, a preocupação era voltada às bactérias Gram-positivas, particularmente o MRSA e o VRE. Atualmente, os microbiologistas clínicos concordam que as bactérias Gram-negativas multirresistentes representam um importante risco para a saúde pública (KUMARASAMY et al., 2010). Dentre as bactérias Gram-negativas, os membros da família *Enterobacteriaceae* são comumente recuperados e responsáveis por infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia, e associadas a dispositivos médicos. Os principais representantes desta família envolvidos em infecções hospitalares são: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia*

marcescens, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* sp. e *Morganella morganii* (PELEG; HOOPER, 2010; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

Essa corroboração entre especialistas a respeito do risco que este grupo de bactérias representa deve-se que, infecções causadas por bacilos Gram-negativos, em especial os membros da família *Enterobacteriaceae* (ou Enterobactérias), apresentam características que são de preocupação particular. Estes organismos são altamente eficientes na regulação ou aquisição de genes que codificam os mecanismos de resistência a antibióticos, muitas vezes usando múltiplos mecanismos contra o mesmo antibiótico ou usando um único mecanismo para afetar vários antibióticos (PELEG; HOOPER, 2010).

Os β -lactâmicos constituem a tradicional primeira linha de antibióticos disponível para o tratamento de infecções causadas por Enterobactérias, tendo como principais classes em uso as penicilinas e cefalosporinas. Estes agentes de primeira linha tornaram-se os primeiros alvos de resistência, atingindo proporções elevadas em várias partes do mundo (DELGADO-VALVERDE et al., 2013). Tal resistência é explicada pela produção de enzimas capazes de degradar o anel β -lactâmico da estrutura química desses agentes - as β -lactamases de espectro estendido (ES β L) - conhecidas como principal mecanismo de defesa de bactérias Gram-negativas contra antibióticos β -lactâmicos. Desde a inserção dos antibióticos β -lactâmicos em uso clínico, a atividade hidrolítica das ES β L foram observadas primeiramente em micro-organismos em que a enzima já era conhecida, porém incomum, como *Staphylococcus aureus*, propagando-se então para patógenos que não possuíam a enzima, como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

Em paralelo ao aumento de resistência a β -lactâmicos, houve aumento das prescrições médicas para o emprego de carbapenêmicos. Os carbapenêmicos (imipenem, ertapenem, meropenem e doripenem) foram as últimas moléculas desenvolvidas com amplo espectro de atividade antimicrobiana. Estes compostos mantiveram sua atividade universal contra

Enterobactérias por cerca de 20 anos após a introdução do imipenem em 1985, mas a resistência agora é acumulativa (LIVERMORE, 2012). Nas Enterobactérias, a resistência aos carbapenêmicos aumenta por dois mecanismos principais: aquisição de genes que codificam a enzima capaz de degradar os carbapenêmicos (carbapenemases) ou diminuição na captação de antibióticos pela deficiência qualitativa e/ou quantitativa da expressão de porinas em associação com a super expressão de ES β L que possuem fraca afinidade pelos carbapenêmicos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

As carbapenemases representam a família mais versátil das β -lactamases e pertencem a duas maiores famílias moleculares – serino carbapenemases e metalo-betalactamases (M β L) –, em que se diferenciam pelo mecanismo hidrolítico no sítio ativo. Em Enterobactérias, as primeiras carbapenemases identificadas foram SME-1, em Londres, no ano de 1982 (YANG; WU; LIVERMORE, 1995) e IMP-1, nos Estados Unidos, em 1984 (RASMUSSEN et al., 1996). Desde então, Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos vêm sendo associadas principalmente como uma consequência da alargada propagação de genes de enzimas carbapenemases. As carbapenemases mais importantes são categorizadas como três tipos de enzimas: a KPC, primeiramente descrita nos Estados Unidos, mas agora encontrada no mundo todo, as M β L VIM, IMP e NDM e a enzima tipo OXA-48 circulando entre os países do Mediterrâneo e progressivamente disseminando-se para outras áreas geográficas (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

No início dos anos 2000, a suscetibilidade aos carbapenêmicos era de 98% entre as Enterobactérias, no qual somente para o imipenem a suscetibilidade apresentava-se em torno de 60 a 83% para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (TURNER, 2005). Atualmente, a real prevalência de cepas produtoras de carbapenemases permanece desconhecida visto que muitos países não relatam as taxas de suscetibilidade aos antimicrobianos. No entanto, a disseminação global de Enterobactérias produtoras de

carbapenemases representa no presente momento um problema significativo para a saúde pública. Estudiosos da área da saúde estimam que pela próxima década o mundo terá testemunhado a grande disseminação de infecções intratáveis, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Para evitar ou ao menos tentar delongar esta crise, muitos pesquisadores têm dedicado seus esforços para esclarecer os fatores que favorecem o desenvolvimento e propagação global de bactérias resistentes a antimicrobianos, ampliando técnicas de detecção e controle. A identificação precoce de cepas produtoras de carbapenemases, tanto em infecções clínicas e /ou no estado de colonização, é imprescindível para prevenir dificuldades ou impossibilidade no tratamento de infecções, dado a redução do aparecimento de novos antimicrobianos no mercado (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a prevalência de Enterobactérias em superfícies inanimadas hospitalares e o perfil da resistência aos β -lactâmicos e carbapenêmicos em hospitais da cidade de Manaus – Amazonas.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar enterobactérias de superfícies inanimadas
- Analisar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias isoladas de superfícies inanimadas;
- Avaliar fenotipicamente a produção de β -lactamases e carbapenemases;
- Avaliar a presença de genes codificadores de enzimas KPC, VIM, IMP e NDM codificadores de carbapenemases;
- Avaliar a presença de genes codificadores de enzimas CTX-M, TEM e SHV codificadores de outras β -lactamases;
- Realizar a caracterização molecular nas enterobactérias produtoras de enzimas β -lactamases.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micro-organismos em superfícies inanimadas

O ambiente hospitalar contaminado por pacientes infectados pode servir como fonte de propagação de bactérias que direta ou indiretamente advém da própria equipe de saúde ou de superfícies inanimadas contaminadas, contribuindo dessa forma para a disseminação de potenciais patógenos à saúde (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2010).

Diversos são os trabalhos publicados confirmando a ocorrência de infecções cruzadas no ambiente hospitalar. A revisão sistemática realizada por Livshiz-Riven e colaboradores (2015) reuniu trabalhos publicados entre janeiro de 1990 a julho de 2013 evidenciando a relação entre transmissão cruzada de micro-organismos e dispositivos clínicos portáteis não-invasivos – manguitos de pressão arterial, aparelhos glicosímetros e termômetros – que são compartilhados entre pacientes. Como resultado, ao final de treze casos enquadrados nos critérios de inclusão as taxas desses dispositivos contaminados variaram de 23% a 100%. Os patógenos mais isolados foram *S. aureus* (86%) e *Enterobacteriaceae* (38%). Em 35% dos trabalhos foi constatada a presença de micro-organismos multidroga resistentes, enfatizando a necessidade de melhorias nas práticas de descontaminação de quaisquer instrumentos médicos compartilhados entre pacientes.

Outros importantes fômites que merecem atenção aos cuidados de higiene e sanitização são pias de enfermarias e expurgos, dado que os micro-organismos são capazes de sobreviver em biofilmes e de crescerem em diversas condições, tornando-se assim um reservatório para a propagação de bactérias com diversos níveis de resistência (STARLANDER; MELHUS, 2012). Além disso, a projeção inadequada de pias pode facilitar a transferência de micro-organismos viáveis para proximidades com o paciente: a água

corrente com fluxo direto contra o ralo da pia ou pias rasas podem se estender para a cama de pacientes e áreas onde os procedimentos assépticos são limitados, fazendo necessária a implementação de barreiras entre pias e estas áreas (ROUX et al., 2013).

Um estudo conduzido por Wolf e colaboradores (2014) acerca da contaminação de pias para lavagens de mãos em quartos de pacientes de centros de terapia intensiva (CTI) de um hospital, evidenciou a presença de bactérias produtoras de enzimas ESβL em todas as pias tratadas como amostras no estudo, obtendo 247 culturas positivas de 260 amostras coletadas por um período de 20 semanas, corroborando com vários estudos a respeito de superfícies inanimadas tratadas como fômites, em que na maior parte dos casos não há registros de notificação. Em quatro pacientes instalados no CTI, foi constatada a transmissão de bactérias presentes nos lavatórios para esses pacientes, uma vez que as pias foram colonizadas com ESβL idênticas antes da admissão dos pacientes no CTI. Um destes pacientes foi ao óbito com infecção por *Enterobacter cloacae* produtor de ESβL procedente dos lavatórios dos quartos do CTI.

Embora a diversidade de trabalhos publicados tratando torneiras e lavatórios como fontes de transmissão sejam os mais corriqueiros, não são os elementos exclusivos e nem mesmo os mais importantes. Não obstante, de acordo com Lerner e colaboradores (2013), cinco são os locais mais suscetíveis de serem contaminados: as superfícies da cama (travesseiro, superfície entre pernas e virilhas), mesa pessoal e bomba de infusão (figura 1). De acordo com este trabalho, as superfícies da cama são apontadas como os locais mais contaminados.

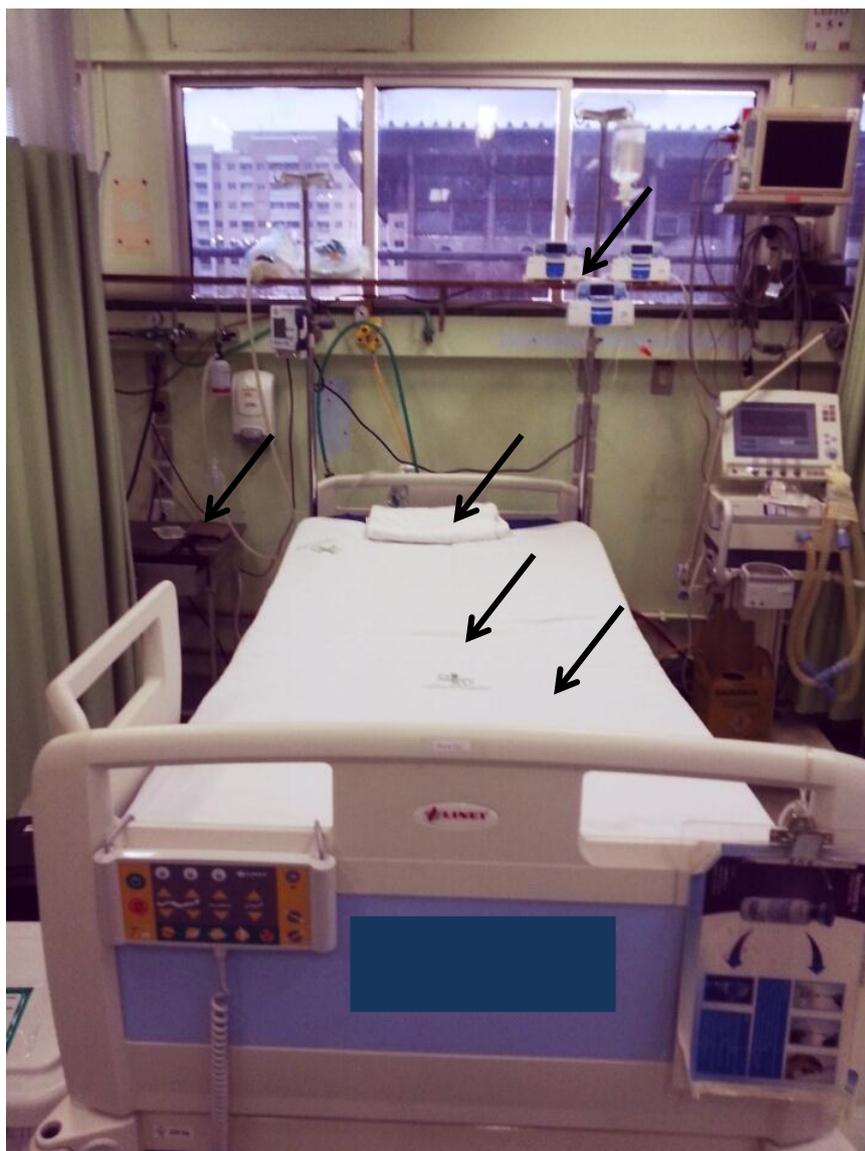


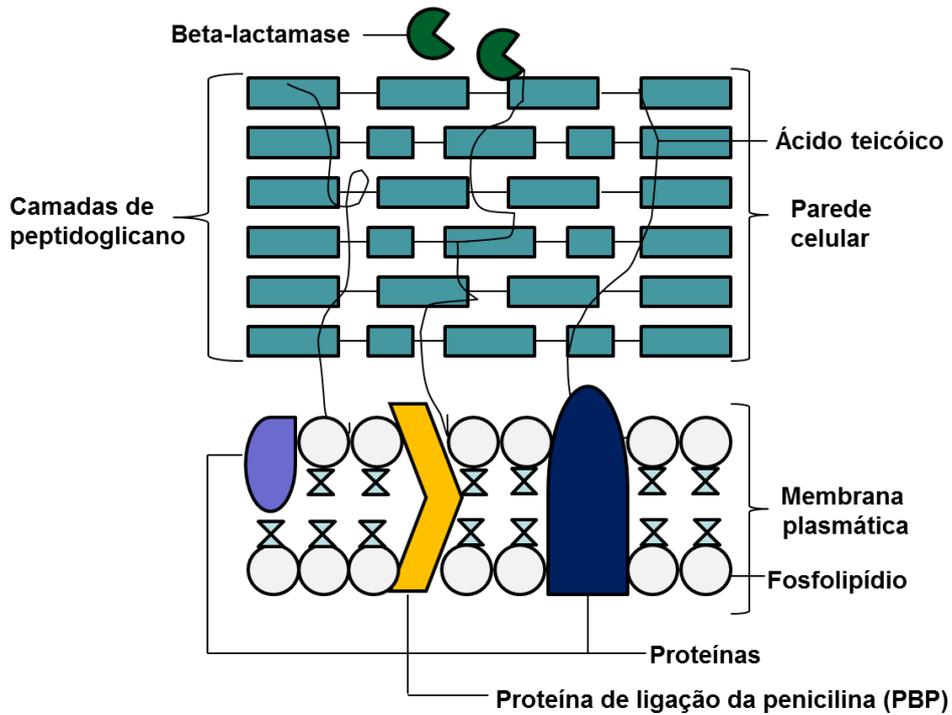
Figura 1: Superfícies inanimadas de enfermarias hospitalares mais suscetíveis à contaminação: mesa pessoal, bomba de infusão, lençol de cama ao redor do travesseiro, pernas e virilhas. Fonte: arquivo pessoal.

Em todo o caso, independente do tipo de superfície inanimada, o entendimento no que diz respeito à contaminação do ambiente hospitalar e propagação de bactérias com variados níveis de resistência a partir de fômites, realça a importância da adesão a regimes de padrões de limpeza para superfícies e dispositivos de pacientes, bem como programas de notificação e intervenção com o objetivo de reduzir a disseminação e transmissão a outros pacientes, evitando assim custos elevados e agravamento da saúde dos mesmos (LERNER et al., 2013).

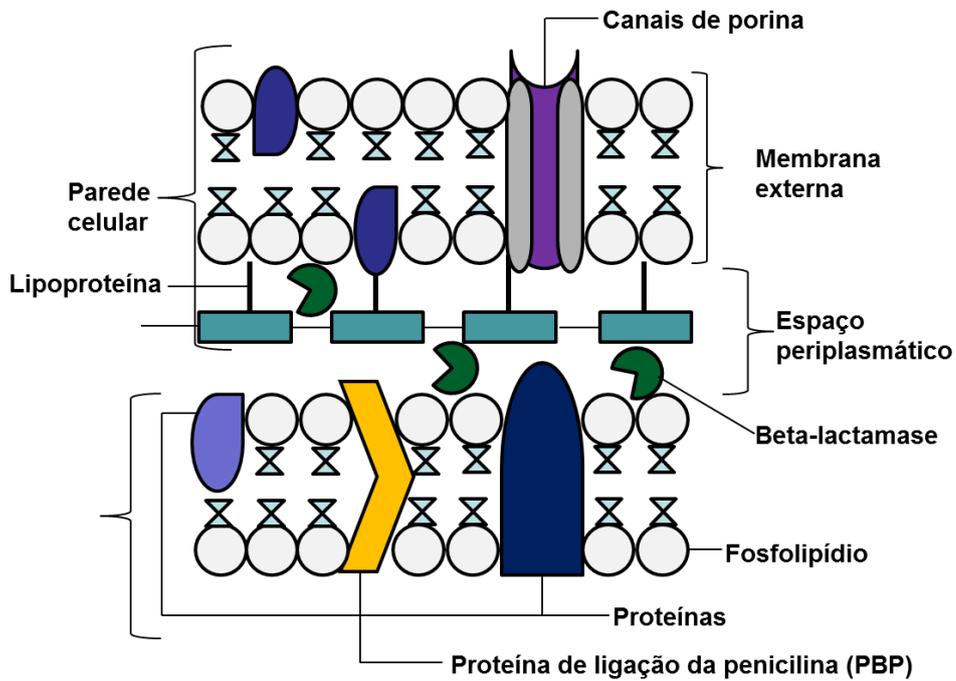
3.2 Bacilos Gram-negativos e membros da família *Enterobacteriaceae*: aspectos gerais e mecanismos de resistência

A medicina moderna vivencia atualmente um delicado cenário a respeito da terapêutica das infecções hospitalares. Essa preocupação engloba a carência de desenvolvimento de novos antimicrobianos, dado o fato de que as terapias de curta duração são menos lucrativas para a indústria farmacêutica do que a produção de medicamentos para doenças crônicas; e o crescente acúmulo e propagação de resistência dos patógenos responsáveis por essas infecções (LIVERMORE, 2011). De todos os agentes envolvidos em infecções hospitalares, as doenças provocadas por bactérias Gram-negativas apresentam características que merecem atenção particular, devido à capacidade de adquirir inúmeros mecanismos de resistência, inibindo antibióticos de espectro variados (PELEG; HOOPER, 2010). Essa explicação é dada em função de diversos elementos, envolvendo a estrutura e funções das células dos Gram-negativos.

Em primeiro ponto, o aspecto mais importante que diferencia espécies Gram-negativas (em especial as Enterobactérias) de espécies Gram-positivas refere-se à dupla parede de membrana, sendo assim uma camada mais complexa, conferindo-lhes propriedades bioquímicas, fisiológicas e genéticas singulares (figura 2).



a) Gram-positivo



a) Gram-negativo

Figura 2: Comparação da estrutura e das paredes celulares de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. (Adaptado de GOODMAN; GILMAN, 2010).

Por possuir caráter hidrofóbico, a membrana externa é impermeável a várias macromoléculas e moléculas hidrofóbicas - como glicopeptídeos, eritromicina e rifampicina - impedindo-as de atravessar a célula Gram-negativa com facilidade, ou ainda, retardam a entrada de drogas que podem atravessá-la, aumentando a eficácia da próxima linha de defesa da bactéria. Nesta linha de defesa encontram-se bombas de efluxo situadas na membrana citoplasmática (figura 3), responsáveis pela captação de moléculas anfipáticas, incluindo antibióticos que entram na membrana, bombeando-as de volta para fora da célula da bactéria. Assim, a combinação de impermeabilidade e liberação de substâncias para fora da célula explica o fato pelas quais as espécies Gram-negativas são mais resistentes que espécies Gram-positivas e justificam também por que novos antibióticos ativos contra a parede celular deste grupo são difíceis de desenvolver (LIVERMORE, 2012; BARBOSA; TORRES, 2005).

Ainda em referência à estrutura, todas as bactérias têm em sua membrana plasmática alvos relacionados à ação das penicilinas e cefalosporinas, que em conjunto denominam-se proteínas de ligação a penicilina (PBP). As PBP de maior peso molecular são responsáveis pela síntese de peptidoglicano da parede celular e constituem os alvos desses fármacos. Porém, como os antibióticos β -lactâmicos inibem muitas PBP diferentes em uma única bactéria (figura 3), é preciso que ocorra uma redução da afinidade de várias PBP pelos β -lactâmicos para que o micro-organismo se torne resistente. Tal redução de afinidade é afetada pela recombinação homóloga entre genes codificadores de PBP de diferentes espécies bacterianas, garantindo assim outro fator de resistência às bactérias (figura 3) (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Outros constituintes de membranas de Gram-negativos são proteínas íntegras designadas porinas, que formam canais hidrofílicos permitindo seleção de nutrientes e outros compostos a entrarem pelos poros, inclusive antibióticos. Dessa forma, a resistência a β -lactâmicos em Gram-negativos pode surgir pela perda da expressão de porinas ou pelo

deslocamento dos tipos de porinas na membrana externa, resultando na redução da taxa de penetração do antibiótico na célula, bloqueio por completo da entrada da molécula na célula ou diminuição efetiva da concentração do fármaco no alvo (figura 3) (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a; PAGES; JAMES; WINTERHALTER, 2008; NIKAIDO, 2003).

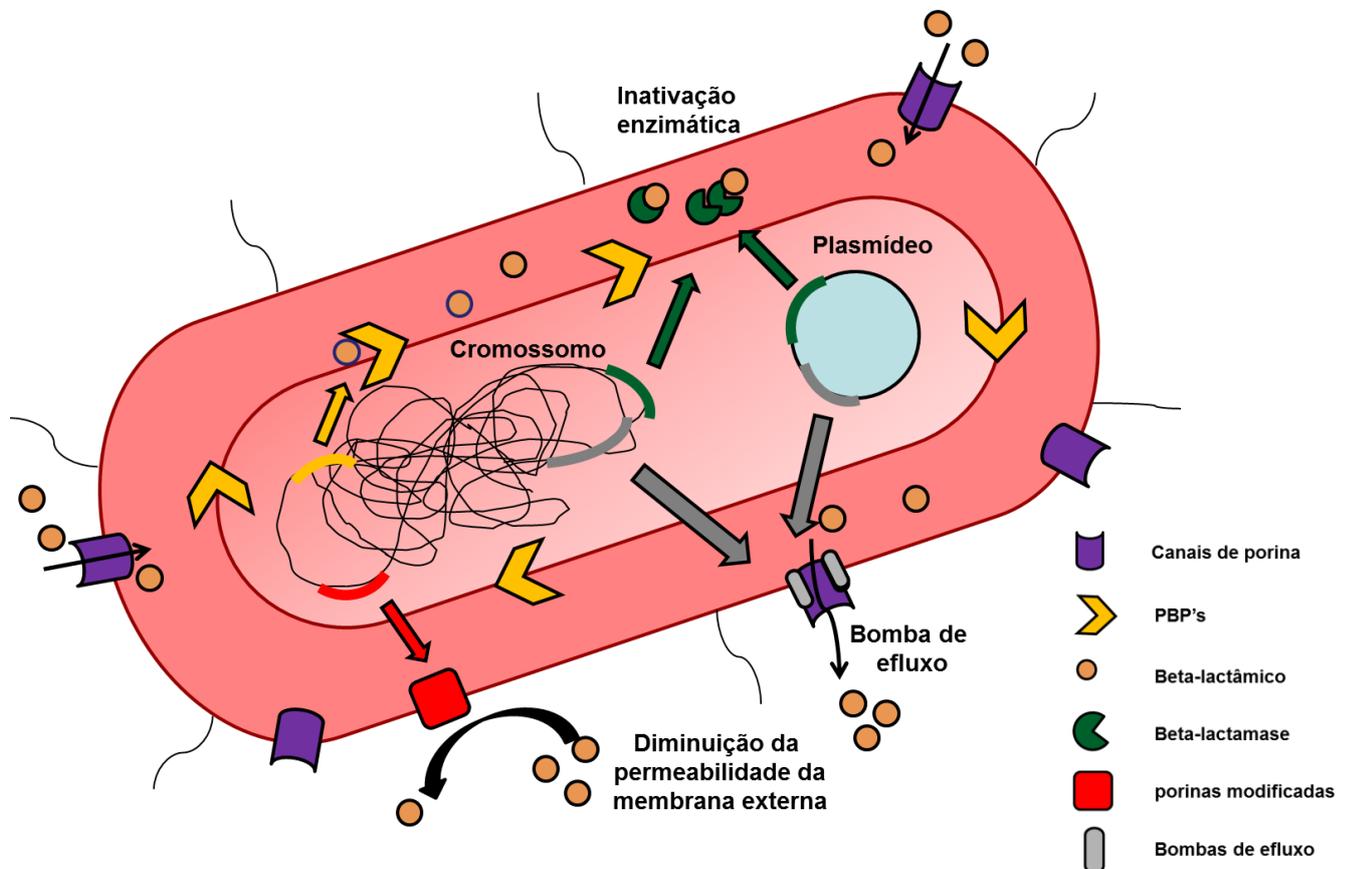


Figura 3 Mecanismo geral de resistência de Gram-negativos. Os principais mecanismos incluem: inativação enzimática do antibiótico por enzimas codificadas por plasmídeo ou cromossomo, adquirindo atividade hidrolítica contra compostos β -lactâmicos; diminuição ou perda da permeabilidade da membrana externa a partir da modificação dos canais de porina ou perda da expressão; efluxo do antibiótico para fora da célula da bactéria em consequência a produção de uma bomba de efluxo. (Adaptado de NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

Por último, entende-se que as enzimas β -lactamases são a maior defesa de bactérias Gram-negativas contra antibióticos β -lactâmicos. Os genes que codificam essas enzimas são localizados no cromossomo, ou, de forma mais comum, adquiridos via elementos genéticos móveis, como plasmídeos (figura 3) (HARRIS; TAMBYAH; TAMBYAH, 2015). Nas bactérias Gram-negativas, as β -lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço

periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os antibióticos β -lactâmicos, que estão atravessando o espaço periplasmático para alcançar as PBPs (LIVEMORE, 1995).

Quanto a outros relevantes compostos aplicados na terapêutica de infecções bacterianas, a resistência a quinolonas resulta na maioria das situações a partir de acúmulos cromossômicos na DNA girase (GyrA) e mutações na topoisomerase IV (ParC). Ademais, podem diminuir a permeabilidade da membrana ou uma super-expressão do sistema de fluxo de bombas diminuir as concentrações da droga e conseqüentemente a diminuição da suscetibilidade. Quanto aos antibióticos aminoglicosídeos, a resistência pode ser em razão de fatores como modificação enzimática, mutações no alvo do antimicrobiano pela metilação do RNA ribossômico e inativação da difusão da membrana externa por meio da perda dos canais de porinas (DELGADO-VALVERDE et al., 2013).

3.3 β -lactâmicos e carbapenêmicos

Após várias décadas da descoberta das penicilinas, os β -lactâmicos estão entre os antibióticos rotineiramente prescritos para tratamento terapêutico de infecções bacterianas (BUSH; MACIELAG, 2010). Trata-se de diversas moléculas classificadas em função de suas estruturas químicas, na qual todas têm um grupo farmacofórico em comum: o anel azetidínico de 4 membros - o anel β -lactâmico, fundido com outro anel de 5 membros (anel tiazodilínico) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os principais representantes da classe consistem nos grupos de penicilinas e cefalosporinas (figura 4) e são subdivididas de acordo com seus variados espectros de ação.

Além da semelhança estrutural, estes antibióticos compartilham do mesmo mecanismo de ação: inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase (que é única em bactérias),

responsável esta pela formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura do peptidoglicano, conferindo assim, rigidez à parede celular (SUARÉZ; GUDIOL, 2009). Embora este mecanismo de ação dos β -lactâmicos seja o mais comum e o mais evidentemente elucidado, as PBP são importantes alvos de ligação às ações de penicilinas e cefalosporinas. Devido à similaridade entre a estrutura dos β -lactâmicos e a estrutura do dipeptídeo D-alanil-D-alanina – o resíduo de aminoácido terminal dos aminoaçúcares que constituem a camada de peptidoglicano – o antibiótico liga-se facilmente e irreversivelmente ao sítio ativo das PBP, inibindo assim a ligação cruzada da camada de peptidoglicano, interrompendo a síntese da parede celular (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Durante as tentativas para desenvolvimento de novos antibióticos, houve a descrição de alguns grupos de β -lactâmicos, como exemplo os monobactâmicos, assim chamados pela ausência do anel tiazolidínico, representados pelo aztreonam; e o grupo das clavamas, representado pelo ácido clavulânico. (figura 4). O mecanismo de ação deste último subgrupo compreende na inibição da enzima β -lactamase, produzida pelas bactérias e são administrados em combinação com penicilinas, ampliando o espectro de ação contra micro-organismos produtores de β -lactamases (figura 4) (GOODMAN; GILMAN, 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os carbapenêmicos (imipenem, ertapenem, meropenem e doripenem) (figura 4) foram os últimos antibióticos de amplo espectro lançados no mercado e são aplicados como tratamento de escolha de infecções graves causadas por bactérias que não respondem a terapias com β -lactâmicos tradicionais (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a; HARRIS; TAMBYAH; PATERSON, 2015). Estes compostos contêm em sua estrutura o anel β -lactâmico fundido com o anel tiazolidínico, onde o átomo de enxofre do anel tiazolidínico é substituído pelo carbono, gerando um anel carbapenêmico (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005). Tal substituição confere aos carbapenêmicos elevada potência e amplo espectro de

atividade, além de resistência às enzimas β -lactamases. Atuam de maneira análoga às penicilinas e cefalosporinas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

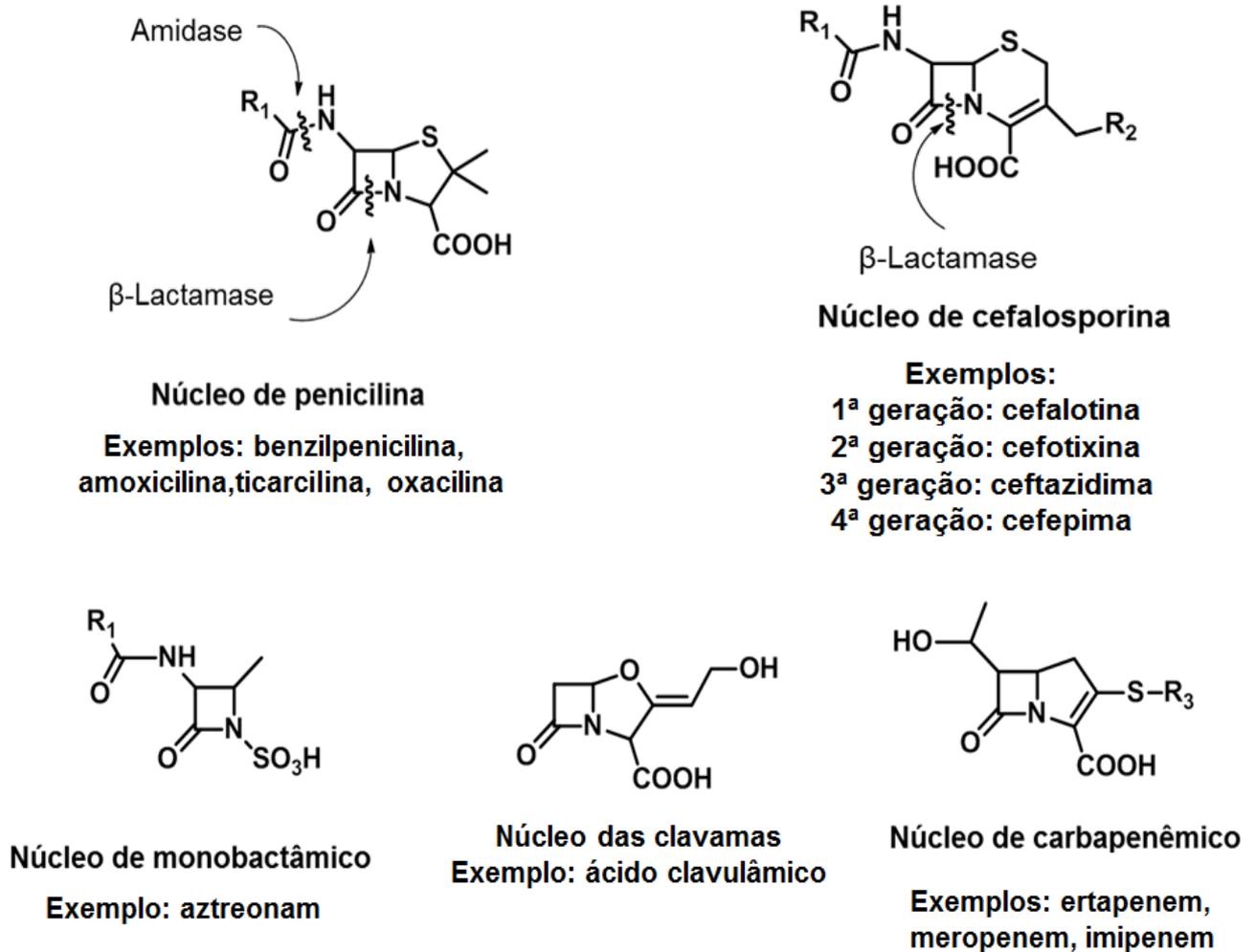


Figura 4 Estrutura elementar dos quatro grupos de β -lactâmicos e ácido clavulâmico. As estruturas representam o anel β -lactâmico e o local de inativação dessas moléculas por β -lactamases. Vários radicais podem ser adicionados em R1, R2, R3 para produzir agentes com espectros de ação diferentes. O ácido clavulâmico, inibidor de β -lactamase atua por ligar-se fortemente à β -lactamase, protegendo outros β -lactâmicos da enzima. (Adaptado de RANG; DALE, 2011).

3.4 β -lactamases

Em meio à ausência de inovação de novas moléculas no mercado, a capacidade das bactérias desenvolverem enzimas responsáveis pela hidrólise de antibióticos disponíveis constitui uma importante e crescente ameaça de saúde pública. Antes mesmo da comercialização da primeira penicilina desenvolvida, Alexander Fleming já previa que as bactérias tivessem a habilidade em desenvolver mecanismos para driblar a ação de cada novo antibiótico lançado no mercado. Com isso, hoje soma-se mais de mil descrições de β -lactamases, com variados espectros de ação, desde as β -lactamases de espectro limitado, com potencial de hidrólise de penicilinas naturais semi-sintéticas até às enzimas com espectro de ação contra carbapenêmicos (ANTUNES et al., 2014; PATERSON; BONOMO, 2005; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

Diversos são os esquemas de categorização das β -lactamases. As duas formas mais utilizadas fundamentam-se na classificação molecular de Ambler (1980), em que as enzimas podem ser agrupadas com base na sua estrutura primária em quatro classes moleculares, variando de A à D; e na classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (1995), com base em seus espectros de substratos (HARRIS; TAMBYAH; PATERSON, 2015) (tabela 1). Na nomenclatura aplicada às enzimas, observa-se que as terminologias não são padronizadas. A enzima SHV, pertencente à classe A, denota a resposta variável a inibidores de sulfidrilas; A enzima TEM (classe A) foi nomeada a partir do primeiro paciente (Temoniera) em que a amostra foi obtida; As enzimas CTX-M (classe A), OXA (classe D), e IMP (classe B) refletem a capacidade de hidrolisar cefotaxima, oxacilina, e imipenem, respectivamente (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

Segundo a classificação de Ambler, as classes A e C de β -lactamases são as mais frequentes e tem um resíduo de serina no sítio ativo e são chamadas de serino β -lactamases,

assim como a classe D. A classe B compreende as metalo- β -lactamases (M β L), que possuem o íon zinco como co-fator no sítio ativo da enzima. (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a). A classe C representa a classe de enzimas que são encontradas no cromossomo de muitas bactérias, também podem ser transferidas por plasmídeos (DELGADO-VALVERDE et al., 2013). E a classe D representa um grupo heterogêneo de β -lactamases denominadas oxacilinas, pela eficiência de hidrólise da oxacilina (DELGADO-VALVERDE et al., 2013).

3.4.1 β -lactamases Classe A

As ES β L pertencentes à classe A são mediadas por plasmídeos e são facilmente transferidas entre diferentes células bacterianas, independente de gênero e espécie, proporcionando rápida resistência a tais enzimas. São ativas contra penicilinas e cefalosporinas (exceto cefamicinas) e o monobactâmico aztreonam, porém sensíveis a inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Os principais grupos representantes dessa classe são: TEM, GES, SHV e CTX-M (DELGADO-VALVERDE et al., 2013; GHAFOURIAN et al., 2014).

A enzima TEM foi descrita pela primeira vez em 1960, originalmente encontrada em *E.coli* isolada de hemocultura de um paciente chamado Temoniera na Grécia (BRADFORD, 2001). Todas elas são ES β L (com exceção de TEM -1 e TEM -2) e são comumente encontrados em *K. pneumoniae* e *E. coli*, podendo ainda aparecer em espécies do gênero *Enterobacter* sp. e Bacilos Gram-negativos Não Fermentadores (GHAFOURIAN et al., 2014). TEM -1 e TEM -2 são β -lactamases de espectro restrito e hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração e até 90% da resistência a ampicilina é em resposta da produção de TEM-1 por Enterobactérias (BRADFORD, 2001). Hoje, são descritas pelo menos 223

tipos de enzimas TEM (<http://www.lahey.org/Studies/>). As variantes TEM-1, TEM-12 e TEM-26 são as mais descritas na América do Sul (DROPA et al., 2009). Embora as ESβL do tipo TEM sejam raramente descritas no Brasil, estudos recentes avaliaram a presença da variante TEM-136 em espécies de *Enterobacter cloacae* de pacientes de um hospital público (NOGUEIRA et al., 2015). No entanto, este estudo confirma a carência de dados acerca da epidemiologia da enzima no Brasil.

O grupo SHV é o segundo grupo de ESβL mais comum no Brasil e em outros países (NOGUEIRA et al., 2015). A variante SHV-1 é a única do grupo que não tem espectro estendido, com resistência apenas à penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. Estudada pela primeira vez em 1979, a maior parte dos tipos de SHV é codificada por plasmídeos de bactérias (GHAFOURIAN et al., 2014), embora alguns estudos comprovem que a enzima é naturalmente codificada pelo cromossomo de algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, e podem ser codificadas por plasmídeos de *E. coli* (BRADFORD, 2001). Na América do Sul, as variantes SHV-2, SHV-5 e SHV-12 são os tipos mais encontrados (DROPA et al., 2009), sendo esta última a prevalente no Brasil (NOGUEIRA et al., 2015). O grupo de enzimas do tipo SVH soma um número de 193 variações (<http://www.lahey.org/Studies/>), amplamente encontradas em espécies de Enterobactérias, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (GHAFOURIAN et al., 2014).

Ao contrário das limitações observadas em variantes de TEM e SHV de espectro limitado, todas as enzimas CTX-M são ESβL. As CTX-M hidrolisam penicilinas, cefalotina, cefotaxima (denotando a origem do nome da classe da enzima “*cefotaximase*”), ceftazidima, cefepima e aztreonam (GHAFOURIAN et al., 2014; BRADFORD, 2001) e desde a sua primeira descrição na Alemanha, o número de variantes de CTX-M aumenta continuamente. Hoje totalizam em 172 tipos de CTX-M descritos em todo o mundo

(<http://www.lahey.org/Studies/>), divididos em cinco grandes grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-15 (NASEER; SUNDSFJORD, 2011).

A revisão sistemática realizada por Rocha, Pinto e Barbosa (2016) sobre a epidemiologia de enzimas CTX-M produzidas por micro-organismos isolados tanto de infecções hospitalares quanto de infecções adquiridas na comunidade em diferentes regiões do Brasil revelou que de 36 estudos incluídos na revisão, a maior parte deles se concentravam na região sudeste, seguido da região sul, sem nenhum dado publicado na região norte.

No Amazonas o trabalho pioneiro de Ferreira e colaboradores (2011), relata a detecção das enzimas em amostras de pacientes do Centro de Hemoterapia (HEMOAM), em que foram descritas as enzimas TEM, SHV, CTX-M e OXA. O estudo, contudo não discrimina à quais variantes cada enzima detectada pertence, evidenciando assim a necessidade de publicações e relatos da epidemiologia local.

3.4.2 β -lactamases Classe C

O genes que codificam as enzimas AmpC, são constitutivamente encontrados no cromossomo de muitas Enterobactérias, como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*. No entanto, os genes também podem ser transferidos por plasmídeos (DELGADO-VALVERDE et al., 2013). A classe é resistente a inibidores de β -lactamases e as enzimas podem ser induzíveis ou não. Na ausência de β -lactâmicos, AmpC é normalmente produzida em níveis basais, mas na presença de indutores como cefoxitina e imipenem sua produção pode aumentar até 1000 vezes (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002).

As enzimas pAmpC (AmpC codificadas por plasmídeo) são provavelmente originárias das AmpC cromossomais, que posteriormente foram mobilizadas por plasmídeos de outras espécies bacterianas (JACOBY, 2009). Até o momento já foram descritas nove famílias:

CMY (136 variantes), FOX (12 variantes), LAT (4 variantes), ACC (5 variantes), MIR (18 variantes), DHA (23 variantes), ACT (38 variantes), MOX (11 variantes) e CFE-1 (<http://www.lahey.org/Studies/>). No Brasil as pAmC são pouco reportadas, sendo FOX-5 e CMY-2 as enzimas mais descritas (CAMPANA et al., 2013).

3.4.3 Carbapenemases classe B

As enzimas hidrolisam praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto o aztreonam. O mecanismo de hidrólise ocorre em função da interação do anel β -lactâmico com o íon zinco no local de ação, o que explica a inibição da enzima por EDTA, que possui atividade quelante de cátions bivalentes. No entanto, as M β L não são inibidas por ácido clavulânico e são encontradas em cepas que codificam outras ES β L (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). Os tipos de M β L mais identificados em Enterobactérias incluem os grupos IMP, VIM e NDM. Geralmente, o nível de resistência a carbapenêmicos observado para cepas produtoras de M β L pode variar, e a mortalidade associada com produção de M β L estende-se de 18% a 67% (DAIKOS et al., 2009; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

As β -lactamases do tipo IMP estavam entre as primeiras M β L adquiridas identificadas e foram detectadas em *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e nas *Enterobacteriaceae* (ZHAO; HU, 2011). Na América do Sul, a primeira descrição de IMP-1 foi no Brasil, em uma cepa de *K. pneumoniae*, em 2003 (LINCOPAN et al., 2005). Desde então são 53 variantes de IMP identificadas em todo o mundo (<http://www.lahey.org/Studies/>), com estudos de endemias no Japão, Taiwan, Leste da China e recentemente Grécia. No entanto, há relatos isolados em muitos outros países (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a).

A primeira enzima do grupo VIM foi identificada em Verona na Itália em 1997 em uma cepa de *P. aeruginosa*. Apesar de apresentar apenas 30% de identidade com as enzimas do tipo IMP, elas apresentam o mesmo perfil de amplo espectro, incluindo todos os β -lactâmicos exceto o aztreonam (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a). O grupo VIM contém 46 variantes (<http://www.lahey.org/Studies/>), distribuídas principalmente em *P. aeruginosa* e em menor proporção em isolados de Enterobactérias. VIM-2 é a M β L mais relatada em todo o mundo, com disseminação endêmica na Grécia, Espanha, Itália, Coreia do Sul e Taiwan (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a). No continente sul-americano o grupo permanece escasso (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014).

Dentro desta temática, o foco atual em todo mundo está voltado para as Enterobactérias produtoras da enzima NDM-1. New-Delhi metallo-beta-lactamase foi detectada pela primeira vez em 2008 em uma cepa de *K. pneumoniae* obtida de um paciente sueco de origem indiana com infecção urinária, hospitalizado em Nova Delhi (dando origem ao nome do grupo de enzima) (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). A enzima propagou-se rapidamente em várias regiões do mundo, chegando ao Brasil em 2013 quando foram reportados os primeiros casos de NDM em Rio Grande do Sul: três pacientes colonizados e um paciente infectado, evoluindo a óbito (CARNEIRO et al., 2014). Outros casos de infecção por NDM foram confirmados em Rio de Janeiro e Brasília no mesmo ano.

3.4.4 β -lactamases classe D

A classe D, também chamado de classe OXA, representa um grupo heterogêneo com variados espectros de atividade: algumas enzimas possuem espectro limitado (a exemplos, a OXA-2 e OXA-10) e outras são ES β L (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ,

2014). A classe D carbapenemases representa uma nova expansão do perfil de substratos da classe D, incluindo os antibióticos carbapenêmicos. Dividida em vários subgrupos, as variantes OXA-23, OXA-24/40, OXA-48 OXA-51, OXA-58 e OXA-143 da classe D carbapenemases são as mais importantes devido à rápida disseminação em bactérias patogênicas, totalizando em 48 tipos de OXA em variados espectros de atividade (ANTUNES et al., 2014; <http://www.lahey.org/Studies/>). No Brasil poucos são os estudos de infecções com bactérias produtoras de OXA carbapenemases, onde primeiro relato de caso de colonização de OXA-48 foi em um paciente no Rio Grande do Sul que permaneceu 30 dias em uma unidade de terapia intensiva após a complicação de uma prostatectomia (CARNEIRO et al., 2014).

3.4.5 Carbapenemases classe A

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* – carbapenemase) são atualmente as de maior importância clínica entre as β -lactamases da classe A de Ambler. Identificadas pela primeira vez na Carolina do Norte – Estados Unidos, em 1996, são descritas atualmente 24 variantes (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a; <http://www.lahey.org/Studies/>). Embora a enzima tenha sido observada pela primeira vez em *K. pneumoniae*, as KPC não são restritas a esta espécie, e já foram relatadas em *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Enterobacter* spp., e *Pseudomonas* spp. (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Os primeiros casos de KPC na América do Sul foram observados na Colômbia (2005) e estudos posteriores evidenciaram a enzima presente no Brasil e Argentina em 2005 e 2006, respectivamente. Desde então, a enzima tornou-se potencialmente endêmica em vários hospitais do Brasil, sendo a variante KPC-2 a única descrita até o momento (BONELLI;

MOREIRA; PICÃO, 2014). No Amazonas, os estudos com KPC-2 são escassos. A primeira descrição de KPC-2 na região consta em um trabalho executado por Pereira e colaboradores (2013), que reuniu amostras de 32 hospitais de 12 estados brasileiros, identificando o plasmídeo carreador e a região flanqueadora do gene *bla*_{KPC} de 113 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC.

Tabela 1: Características das principais β -lactamases encontradas em Enterobactérias (Adaptado de NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012a; DELGADO-VALVERDE, 2013; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Classe Molecular	Sub-grupo funcional	Enzima	Codificação: Plasmídeo/	Espectro de Ação	Inibidores CLAV/ EDTA	Principais representantes	Nº de variantes (2016)
A	2b	TEM	P	Penicilinas naturais, semi-sintéticas, cefalosporinas 1 ^a geração		TEM-1, TEM -2	-
		SHV	P/ C			SVH-1	-
	2be	TEM	P	Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a a 4 ^a gerações, aztreonam	+ / -	TEM-136	223
		SHV	P			SHV-12	193
		CTX-M	P			CTX-M-2 e CTX-M-15	172
B	2f	KPC	P	Penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos	\pm / -	KPC-2	24
		IMP	P			IMP-1	53
	3a	VIM	P	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos	- / +	VIM-2	46
		NDM	P			NDM-1	16
		CMY	P			CMY-2	136
		FOX	P/ C			FOX-5	12
C	1	ACC	P/ C	Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a gerações, aztreonam	- / -	-	5
		MIR	P/ C			-	18
		MOX	P/ C			-	11
		DHA	P/ C			-	23
D	2d	OXA	P	Cloxacilina e oxacilina		OXA-1 e OXA-10	-
	2df	OXA	P	Beta-lactâmicos e carbapenêmicos	\pm / \pm	OXA-23 e OXA-48	498

Abreviatura: P, plasmídeo; C, cromossomo; CLAV/EDTA, ácido clavulânico / ácido etilenediaminotetraacético

Abrangendo o cenário de disseminação de micro-organismos multirresistentes em superfícies hospitalares, os estudos que discorrem sobre superfícies inanimadas como foco de transmissão de bactérias relacionam que a maior parte desses estudos trata-se de cepas produtoras de ESβL. O trabalho detalhado por Roux e colaboradores (2013) sobre ESβL em pias utilizadas para lavagem de mãos em um centro de terapia intensiva divulgou que, de 135 pias coletadas, 55 foram contaminadas por Enterobactérias produtoras de ESβL. Destas, a maioria (33) pelo gênero *Klebsiella*, seguido pelo gênero *Enterobacter*, em 18 pias. Em duas unidades de CTI, inúmeras pias contaminadas foram encontradas com uma única cepa de ESβL produzida por Enterobactérias, sugerindo uma propagação endêmica.

As pias de lavagem do estudo citado apresentavam-se como potencial fômite de contaminação cruzada: pacientes infectados por cepas produtoras de ESβL poderiam acumular essas cepas nas pias e outros pacientes imunocomprometidos podem se infectar com as mesmas. Segundo o estudo, 44% das pias eram usadas para lavagens de mãos bem como para eliminação de fluidos corporais; 23 dessas pias foram contaminadas por cepas produtoras de ESβL. Tais resultados corroboram com vários outros estudos que refletem a diversidade Enterobactérias produtoras de ESβL transportadas aos pacientes a partir de fômites hospitalares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, a partir da análise microbiológica das superfícies inanimadas das enfermarias de 2 hospitais da cidade de Manaus – Amazonas: Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) e o Instituto da Criança do Amazonas (ICAM).

4.2 Aspectos éticos

A pesquisa não envolveu seres humanos, bem como prontuários de pacientes. Foi concedido um termo de anuência (anexos), para realização do estudo pelas diretorias de ensino, pesquisa e extensão dos dois hospitais inseridos neste estudo.

4.3 Tipo de amostra e coleta

Foram selecionadas para este estudo amostras de Enterobactérias isoladas de superfícies hospitalares, coletadas entre novembro de 2013 e setembro de 2015. As superfícies inanimadas consistiram em estruturas laterais e colchão de leitos e torneiras de enfermarias, de banheiros de enfermarias e de expurgos das enfermarias hospitalares.

O tamanho das amostras (leitos e torneiras) de cada hospital foi determinado com auxílio do programa gratuito com código aberto para estatísticas epidemiológicas – OpenEpi (disponível em: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). O cálculo do tamanho da amostra foi feito em base de 20% de frequência do total de amostra de cada superfície de cada hospital, em que segundo Weber e colaboradores (2010) estima-se que 20% das infecções

relacionadas à assistência a saúde são atribuídas à superfícies inanimadas. O intervalo de confiança utilizado para o cálculo foi de 95%.

O Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) é um hospital de grande porte, com acomodação de diferentes especialidades, possuindo 154 leitos distribuídos em seis enfermarias: clínica médica, clínica cirúrgica, ortopedia, nefrologia, centro de terapia intensiva (CTI) e neurologia (que não foi incluída neste estudo por ter sido desativada por motivos de obras). Considerando o valor de 20% de frequência e intervalo de confiança de 95%, 95 leitos foram avaliados. O hospital possui 72 torneiras em enfermarias, distribuídas em banheiros, expurgos e acomodações principais. Deste total, 56 torneiras foram coletadas.

O Instituto da Criança do Amazonas (ICAM) é um hospital de menor complexidade, com especialidade em atendimento à população infantil de vários municípios do estado. Ao contrário do HUGV, o instituto também tem atendimento ambulatorial. Apenas as enfermarias de internação foram incluídas no estudo. Com um total de 124 leitos distribuídos em três andares de instalação, 83 foram coletados. Das 65 torneiras distribuídas em enfermarias, 50 foram analisadas. Em ambos os hospitais as superfícies foram coletadas de forma randômica.

A recuperação das amostras das superfícies foi feita conforme especificações do método proposto por Hedin, Rynbäck e Loré (2010). Seguindo este estudo, a coleta consistiu em utilizar dois swabs subsequentes: um swab de algodão estéril em tubo com haste plástica (Absorve®), umedecido em solução NaCl 0,9% estéril (Casa da Química®), que foi utilizada como solução de amostragem e colocada no tubo antes da coleta (1mL); e um swab de algodão estéril com haste de madeira (Decrau®).

Preconizou-se que as coletas fossem realizadas pela manhã, após a higienização das enfermarias pelas equipes de limpeza dos hospitais, como forma de avaliar a eficácia de sanitização. O swab em tubo com solução salina foi aplicado sobre a superfície do colchão em um padrão zig e zag, rodando-o e pressionando-o, repetindo o padrão em um ângulo de 90° à

primeira fricção e retornando-o ao tubo com solução salina. O segundo swab foi aplicado à superfície no mesmo padrão de modo a absorver a solução que permaneceu após a conclusão do primeiro swab, colocando-o no mesmo tubo (figura 5). As cobertas dos colchões foram removidas para execução da coleta. O procedimento foi repetido nas estruturas laterais dos leitos. Em torneiras aplicou-se a mesma sequência de swabs, inserindo-os no corpo interior em movimentos giratórios.

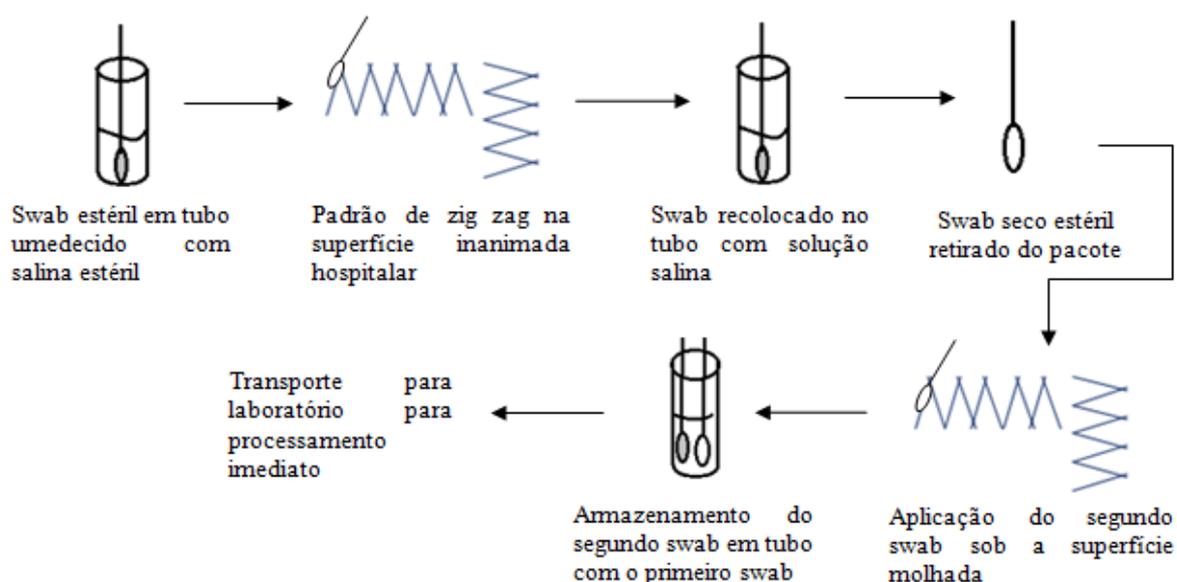


Figura 5: Esquema de coleta de superfícies inanimadas hospitalares, conforme descrito por Hedin e colaboradores (2010).

Os tubos com swabs foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Depois de deixados em repouso por cinco minutos, fez-se agitação em vórtex para melhor desprendimento das bactérias. Uma alíquota de 100 μL da solução formada foi semeada com alça de Drigalsk em meio ágar MacConkey (BD DifcoTM®) – seletivo para Gram-negativos, preparados conforme especificações do fabricante.

Uma única placa de Petri com o meio de cultura foi semeada para cada superfície coletada. Em seguida, fez-se a incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Na eventualidade de crescimento

em ágar MacConkey (BD Difco™®), fez-se a análise da morfologia das colônias, bem como a análise presuntiva de fermentação de lactose no meio. Os isolados foram transferidos para caldo Brain Heart Infusion – BHI (Himedia®) para montagem de um banco de micro-organismos e estocados a temperatura ambiente até a finalização de todas as coletas. Em placas com crescimento de mais de um tipo de colônia, procedeu-se com a transferência de cada uma delas para caldo BHI diferentes.

4.4 Isolamento e identificação das Enterobactérias

Ao término das coletas, fez-se um novo repique dos isolados em caldo BHI de modo a viabilizar as bactérias com metabolismo lento, antes do repique para meio sólido. A partir do crescimento em caldo BHI, realizou-se o isolamento em ágar MacConkey (BD Difco™®) para certificação de crescimento de apenas bactérias Gram-negativas. As colônias isoladas foram submetidas à identificação por testes fenotípicos empregando-se painéis para identificação disponível comercialmente.

A partir da avaliação da atividade da enzima Citocromo oxidase (Laborclin ®) e da determinação de fermentação dos açúcares em ágar Triple Sugar Iron - TSI (BD Difco™®) fez-se a distinção dos Gram-negativos isolados em BGN-NF e membros da família *Enterobacteriaceae* (figura 6). A identificação foi aplicada apenas aos micro-organismos triados como membros da família *Enterobacteriaceae*.

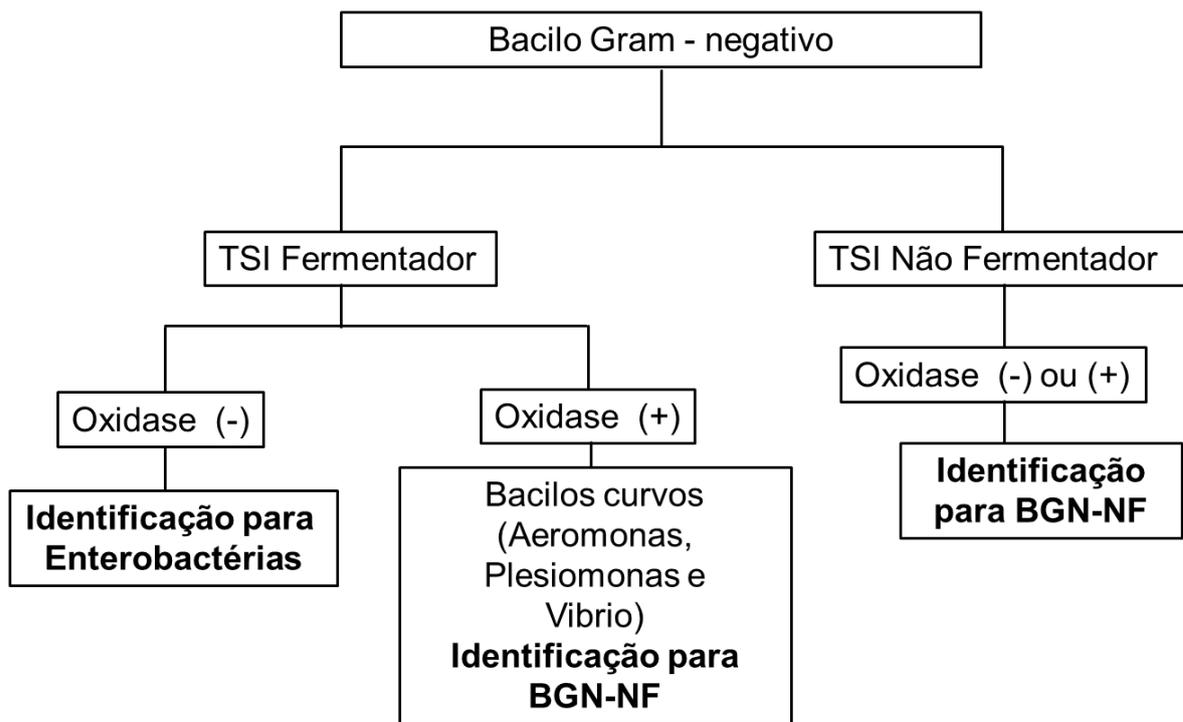


Figura 6: Fluxograma para triagem e identificação dos Gram-negativos

O kit comercial utilizado para identificação fenotípica foi do fabricante Probac do Brasil®, Painel para Enterobactérias. O kit fornece provas como produção de indol, citrato de Simmons, produção de H₂S, hidrólise da uréia, triptofano desaminase, descarboxilação de lisina, descarboxilação de arginina, descarboxilação de ornitina, malonato, fermentação de glicose, fermentação de lactose, fermentação de sacarose, fermentação de manitol, fermentação de adonitol, fermentação de mioinositol, fermentação de sorbitol, fermentação de rafinose, fermentação de ramnose, fermentação de maltose, fermentação de melobiose, β-D-galactosidase e hidrólise da esculina.

Para cada amostra uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) foi preparada em solução salina (Casa da Química®) a partir do crescimento em ágar MacConkey e 100 µL da suspensão foram inoculados em cada poço contendo os meios de cultura liofilizados. O conjunto com os meios liofilizados foi incubado a 35±2°C por 24h e fez-se a leitura das provas bioquímicas com

cartão de interpretação disponibilizado pelo kit. Para identificação do micro-organismo, os resultados da leitura das provas foram submetidos ao programa de software Painel Enterobactérias PROBAC®.

Como confirmação de identificação, as Enterobactérias isoladas foram submetidas à análise por espectro de massas através da tecnologia *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* (MALDI-TOF-MS) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – LIMM. A partir do isolamento das amostras em ágar MacConkey (Oxoid®), as colônias isoladas foram tocadas com palitos de madeira estéreis e então depositadas na placa metálica (*Sample target*) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF MicroflexLT (Bruker Daltonics) de modo a depositar ao menos 10^5 células microbianas em cada poço. A placa inoculada foi mantida em fluxo laminar até a completa secagem do material depositado. Cada microrganismo foi analisado em duplicata.

A cada alvo na placa metálica onde é inoculada a amostra a ser identificada, foi adicionado 1 μ L da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA - Sigma®, USA) preparada em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2.5% (Sigma®, USA). Como calibrante para as análises e controle do processamento das amostras, foi empregada a cepa *Escherichia coli* J53, processada da mesma maneira com a qual foi obtido o material das amostras-teste. Após secagem da mistura e formação dos cristais, a placa metálica foi inserida no aparelho para a leitura das amostras. Os espectros de massa das amostras foram obtidos no modo linear, observando os seguintes parâmetros: frequência do laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18.6 kV, respectivamente; faixa de peso molecular 2.000 a 20.000 Da.

Após esta calibração, utilizando como referência o espectro das proteínas ribossômicas da cepa *E. coli* J53, os espectros obtidos foram processados pelo software Biotyper versão 3.1

(Bruker Daltonics) em modo operacional padrão, o qual realiza a pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência de maneira a encontrar o espectro que mais se assemelha ao obtido com a amostra. Como resultado, foi apresentada uma tabela contendo a designação de dez micro-organismos que apresentam os espectros mais semelhantes aos da amostra testada, os quais estão organizados em ordem decrescente de pontuação, ou escore, que podem variar entre 0,0 e 3,0. Valores de escore superiores a 1,7 indicam identificação microbiana, valores entre 1,7 e 2,0 indicam uma possível identificação do gênero e valores entre 2,0 e 2,3 fecham a identificação de gênero e uma possível identificação de espécie. Para valores de escore superiores a 2,3 considera-se que a identificação de gênero e espécie obtida é confiável.

4.5 Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliado pela técnica de disco-difusão conforme descrito no documento M02-A11, do Clinical Laboratory Standard Institute – CLSI (CLSI, 2012). Para cada amostra fresca, crescida em ágar MacConkey foi preparada uma suspensão bacteriana em 4 mL de solução salina (Casa da Química®) com turbidez comparável à escala 0,5 McFarland. Após homogeneização, a suspensão foi semeada em uma placa de Ágar Mueller-Hinton (Himedia®) utilizando um swab estéril (Decrau®), em 8 diferentes direções. Os discos de antibióticos foram aplicados na placa com 50 mm de distância entre eles. As placas semeadas com os discos foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 16-18 horas.

Os agentes antimicrobianos testados e as respectivas concentrações foram: Ampicilina – AMP 10 µg (Laborclin®), Cefalotina – CFL 30µg (Sensidisc®), Ceftriaxona – CRO 30µg (Sensidisc®), Ceftazidima – CAZ 30µg (Sensidisc®), Cefepime – FEP30 µg (Oxoid®), Meropenem – MEM 10µg (Laborclin®), Imipenem – IMP 10µg (Laborclin®),

Aztreonam – ATM 30µg (Sensidisc®), Amicacina – AMI 30µg (Sensidisc®), Gentamicina – GEN 10µg (Sensidisc®), Tobramicina – TOB 10µg (Sensidisc®) e Ciprofloxacina – CIP 5mcg (Sensidisc®). A seleção dos discos de antimicrobianos assim como os padrões interpretativos dos halos de inibição basearam-se no documento M100-S25 também do CLSI (CLSI, 2015).

4.6 Detecção fenotípica de ESβL por disco aproximação

O teste de detecção fenotípica da produção de ESβL foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Jarlier e colaboradores em 1988. Foi preparada uma suspensão em 4 mL de solução salina (Casa da Química®), com turbidez correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. A suspensão depois de homogeneizada foi semeada em uma placa de ágar Mueller-Hinton (Himedia®) utilizando um swab estéril (Decrau®) em 4 direções diferentes. Em seguida os discos de Aztreonam – ATM 30µg (Oxoid®), Ceftriaxona – CRO 30µg (Oxoid®), Ceftazidima – CAZ 30µg (Oxoid®), Cefepime – FEP 30µg (Oxoid®) foram colocados com 20 mm (centro a centro) de distância de um disco de Ticarcilina/ Ácido Clavulânico – TIM 75/10mcg colocado no centro da placa, conforme ilustrado na Figura 7. As placas foram incubadas por 16-18 horas, em temperatura de 35±2°C.

Após esse período, foi verificada a presença de uma zona de inibição entre os discos contendo os substratos e aquele contendo o inibidor de β- lactamase. O teste foi considerado positivo para a produção de ESβL quando houve o aparecimento de deformações do halo de inibição ou o de uma zona fantasma entre o substrato e o inibidor, para pelo menos um dos substratos testados. Para o controle de qualidade, foi incluída nos testes de detecção fenotípica a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, produtora de ESβL e a cepa de *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo.

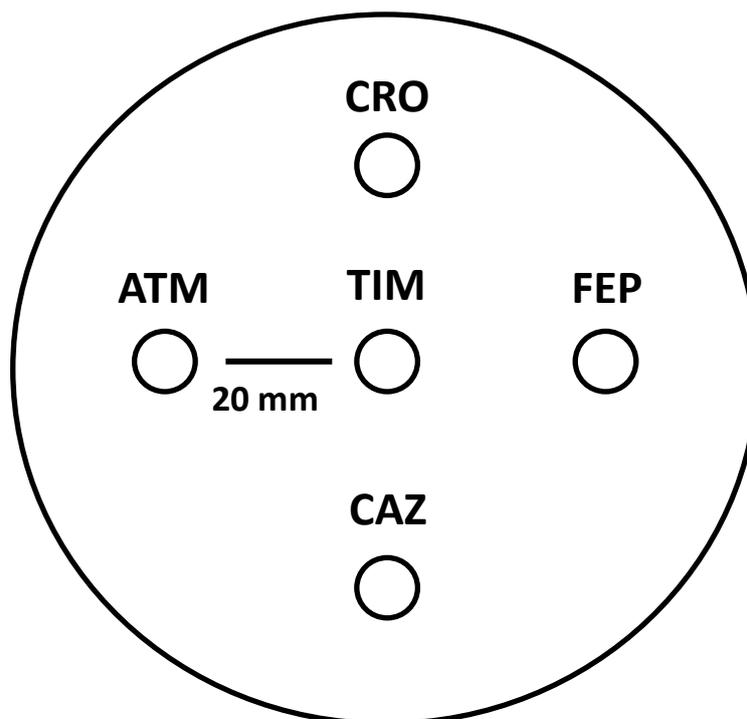


Figura 7: Placa modelo de disco aproximação utilizada para a detecção fenotípica da produção de ES β L. CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; ATM; aztreonam; AMC, ticarcilina/ácido clavulânico.

4.7 Teste fenotípico de carbapenemases CARBA NP

O teste fenotípico para determinação de carbapenemases foi realizado fazendo uma modificação do estudo proposto por Nordmann, Dortet e Poirel (2012b). Cada isolado a ser testado foi semeado em placas de ágar Mueller Hinton (Oxoid®), incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h. A partir do crescimento bacteriano fez-se a suspensão com alça calibrada de 10 μL repleta de colônias puras em 500 μL de tampão de lise Tris-HCl 20 mM – pH 7,5 em microtubo de 1,5 mL (Eppendorf®).

Os microtubos com suspensão foram agitados em vórtex para homogeneização e submetidos a sonicação em banho (47 kHz. \pm 6% / 60W) por 1 hora. Em uma microplaca de fundo redondo com 96 poços (Cralplast®), 30 μL do sobrenadante foram incubados com 100 μL de vermelho de fenol (Merck®) acrescido de 0.1 mM ZnSO_4 (Merck®) e também em 100

μL de vermelho de fenol acrescido de 0.1 mM ZnSO_4 , 6 mg/mL de imipenem e cilastatina 500/500 mg (Tienam, Merck®). A solução de vermelho de fenol foi preparada com 2 mL de solução de vermelho de fenol 0,5% com 16,6 mL de água destilada, ajustando o pH para 7,8 pela adição de NaOH 1 N.

Um terceiro poço foi preenchido com 30 μL de suspensão bacteriana acrescido de 100 μL de vermelho de fenol, 6mg/mL de imipenem e cilastatina 500/500 mg e 0,06 M EDTA. A placa com as amostras em teste foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 1 hora. Em seguida verificou-se a coloração formada para interpretação dos resultados. O teste foi considerado positivo para produção de carbapenemases em todas as amostras cuja cor do poço mudou de vermelho para amarelo/laranja, enquanto que os isolados não produtores de carbapenemases permaneceram vermelhos (figura 8).

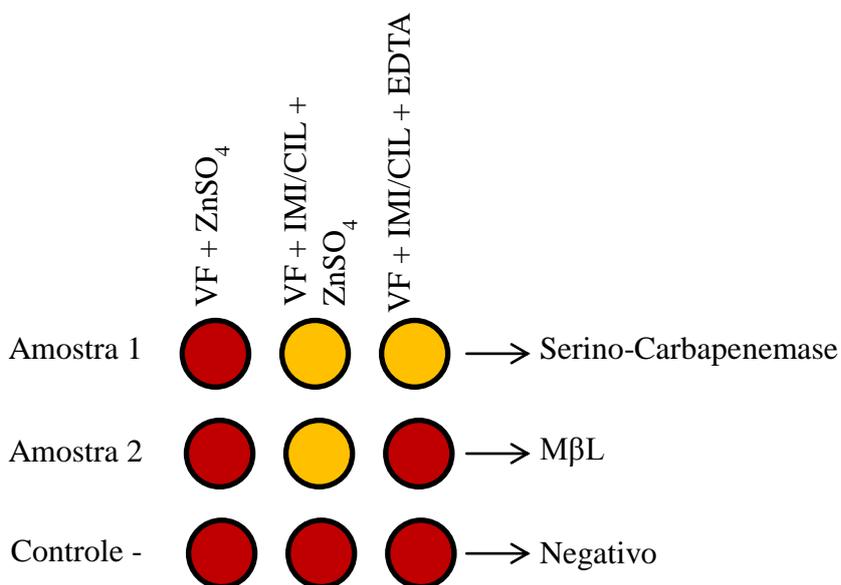


Figura 8: Resultado representativo do teste de Carba NP e possíveis padrões de interpretação. VF, vermelho de fenol; IMI/CIL, imipenem + cilastatina 500/500 mg.

O controle de qualidade do teste foi realizado com a cepa de *E.coli* J53, como controle negativo do teste; cepa de *K. pneumoniae* Kp13, como controle positivo para produção de KPC-2; e cepa de *K. pneumoniae* 2146 produtora de NDM-1, proveniente do banco interno do laboratório.

4.8 Identificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e multiplex

A caracterização genética foi procedida por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou multiplex. A caracterização genética foi aplicada aos isolados interpretados como positivos para ES β L e carbapenemases nos testes fenotípicos de disco aproximação e Carba NP, respectivamente. Como controles positivos das reações de PCR foram utilizadas cepas caracterizadas geneticamente pelo Laboratório Alerta (tabela 2), da Universidade Federal de São Paulo, cedidas gentilmente pela professora Dra. Ana Cristina Gales ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica em nome da professora Dra. Renata Cristina Picão. Como controles negativos foram utilizadas alíquotas de água deionizada.

Cada amostra bacteriana positiva nos testes descritos acima foi cultivada em ágar Müeller Hinton (Oxoid®) pelo método de esgotamento e incubada a 35 \pm 2°C por 24 horas. Uma colônia de cada amostra foi preparada em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf®) contendo 300 μ L de água deionizada. Essa suspensão foi utilizada diretamente para as reações de PCR e congeladas a -20°C até conclusão de todas as reações. A marca de todos os iniciadores utilizados foi Invitrogen®.

Tabela 2: Cepas controle utilizadas nas reações de PCR (Laboratório ALERTA)

Amostra	Gene
<i>K. pneumoniae</i> A28006	<i>bla</i> _{KPC-2} e <i>bla</i> _{SHV-11}
<i>K. pneumoniae</i> 2146	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>K. pneumoniae</i> 283	<i>bla</i> _{OXA-48}
<i>K. pneumoniae</i> KOZ-Ban2	<i>bla</i> _{GES-5}
<i>K. pneumoniae</i> A28006	<i>bla</i> _{CTX-M-2} e <i>bla</i> _{TEM-1}
<i>K. pneumoniae</i> Rio1	<i>bla</i> _{CTX-M-8}
<i>E. coli</i> 391	<i>bla</i> _{CTX-M-9}
<i>K. pneumoniae</i> A13309	<i>bla</i> _{IMP-1}
<i>Enterobacter cloacae</i> 75-10433 ^a	<i>bla</i> _{VIM-1}
<i>P. aeruginosa</i> 73-5671	<i>bla</i> _{GIM-1}
<i>Acinetobacter baumannii</i> 03-9-T104	<i>bla</i> _{SIM-1}
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997 ^a	<i>bla</i> _{SPM-1}
<i>E. coli</i> transconjugante pBL23	<i>bla</i> _{LAT-1}
<i>E. coli</i> transconjugante 200	<i>bla</i> _{FOX-5}
<i>E. coli</i> transconjugante C600 R96D	<i>bla</i> _{MIR-1}
<i>Morganela morganii</i> 386	<i>bla</i> _{DHA-1}
<i>Hafnia Alvei</i> A7307	<i>bla</i> _{AAC}

A análise dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} foi executada por reação de PCR convencional. Em fluxo laminar foi preparada separadamente uma solução mãe para cada gene a ser estudado, contendo: H₂O deionizada, Master Mix (GoTaq[®] Green Master Mix) e iniciadores com concentrações de 10 µM e concentrações finais de 0,5 µM. As soluções mãe foram mantidas em gelo durante todo o preparo e após homogeneização 9 µL de cada solução mãe foi transferido para seus respectivos tubos de amplificação previamente identificados com os genes de interesse contendo 1 µL de cada suspensão bacteriana.

A avaliação da presença de genes codificadores de ESβL *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-1,2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-9} foi executada por PCR multiplex. Duas soluções mãe com volume final de 25 μL foram preparadas: reação “a” para análise de genes codificadores enzimas CTX-M, com água deionizada, Master Mix (GoTaq® Green Master Mix) e iniciadores a 10 μM; e reação “b” para avaliação de genes codificadores de SHV, TEM e GES, contendo água deionizada, Master Mix (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, EUA) e 10 μM de iniciadores. A concentração final de cada iniciador em cada reação foi de 0,4 μM.

Ambas as soluções mãe foram mantidas em gelo após seu preparo e 23 μL da reação ‘a’ foi transferido para tubos de amplificação identificados como reação “a” e 23 μL da reação “b” foi transferido para tubos de amplificação identificados como reação ‘b’. Dois μL de suspensão de cada amostra foram adicionados aos tubos de amplificação.

Para avaliação dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} e *bla*_{SPM} codificadores de MβL foi realizada uma reação de PCR multiplex, em que a solução mãe foi preparada em fluxo laminar com os seguintes componentes: água deionizada, Master Mix (GoTaq® Green Master Mix) e iniciadores a 10 μM, com concentração final de 0,5 μM. Vinte e quatro μL da solução mãe foi colocada em tubos de amplificação com 1 μL de cada suspensão bacteriana.

Uma terceira reação de PCR multiplex foi realizada para amplificação de genes codificadores de enzimas AmpC: para detecção dos genes *bla*_{LAT-1} a *bla*_{LAT-4}, *bla*_{CMY-2} a *bla*_{CMY-7}, *bla*_{BIL-1}, utilizaram-se os primers CITM-F e CITM-R; para os genes *bla*_{DHA-1} e *bla*_{DHA-2}, os primers DHAM-F e DHAM-R; para o gene *bla*_{ACC}, os primers ACCM-F e ACCM-R; para os genes *bla*_{MIR-1T} e *bla*_{ACT-1}, os primers EBCM-F e EBCM-R; e para os genes *bla*_{FOX-1} a *bla*_{FOX-5b}, os primers FOXM-F e FOXM-R.

A solução mãe foi preparada com os constituintes: água deionizada, Master Mix (GoTaq® Green Master Mix) e 10 μM de cada iniciador. A concentração final dos iniciadores

CITM-F, CITM-R, DHAM-F e DHAM-R foi de 0,3 μM ; ACCM-F, ACCM-R, EBCM-F e EBCM-R foi de 0,252 μM ; e FOXM-F e FOXM-R foi de 0,2 μM respectivamente. O volume final da reação foi de 25 μL : 22,5 μL de solução mãe + 2,5 μL de cada suspensão bacteriana.

Após a amplificação do DNA em termociclador (Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler), a revelação dos produtos amplificados de todas as reações descritas foi realizada por eletroforese com aplicação de alíquotas de 8 μL dos produtos amplificados em gel de agarose 2% (Inlab®) com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídeo em condições de corrida eletroforética de 50 minutos, 90V e 120 Å, seguida de visualização sob luz ultravioleta (ImageQuant™ LAS 4000 GE Healthcare Life Science). Um marcador de DNA de 100-pb da Life-Technologies foi utilizado

Os iniciadores e as condições de termociclagem utilizadas para todas as reações descritas acima estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos e condições de termociclagem utilizadas para a amplificação dos genes pesquisados

Reação de PCR	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')		Gene alvo	Tamanho do amplicon	Condições de termociclagem	Referência
PCR Single Carbapenemases	KPC-F	GCTACACCTAGCTCCACCTTC	<i>bla</i> _{KPC}	800 pb	Desnaturação 95°C – 7 min Desnaturação 95°C – 40 seg	Hossain et al., 2004
	KPC-R	TGGAGGGCCAATAGATGATT				
	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTT TC	<i>bla</i> _{NDM}	621 pb	Anelamento 54°C – 45 seg Extensão 72°C 40 seg	
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCAC GATC				
	OXA 48-F	TGGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla</i> _{OXA-48}	743 pb	35 ciclos Extensão final 72° - 10 min	
	OXA 48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC				
PCR multiplex Metallo-β-lactamases (MBL)	IMP-F	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	<i>bla</i> _{IMP}	188 pb	Desnaturação 94°C – 5 min Desnaturação 94°C – 20 seg Anelamento 55°C – 45 seg Extensão 72°C – 30 seg 35 ciclos Extensão final 72°C – 10 min	Mendes et al., 2007
	IMP-R	CCAAACYACTASGTTATC				
	VIM-F	GTTTGGTTCGCATACGCAAC	<i>bla</i> _{VIM}	382 pb		
	VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG				
	SPM-F	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	<i>bla</i> _{SPM}	798 pb		
	SPM-R	CCTTTTCCGCGACCTTGATC				
	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	<i>bla</i> _{GIM}	72 pb		
	GIM-R1	CGGAACGACCATTGAATGG				
	SIM-F1	GTACAAGGGATTCGGCATCG	<i>bla</i> _{SIM}	569 pb		
SIM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG					

Reação de PCR	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Gene alvo	Tamanho do amplicon	Condições de termociclagem	Referência	
PCR multiplex Serino β -lactamases	GES-F	AGCAGCTCAGATCGGTGTTG	<i>bla</i> _{GES}	750 pb	Desnaturação 95°C – 10 min Desnaturação 95°C – 30 seg Anelamento 54°C – 30 seg Extensão 72°C – 45 seg 30 ciclos Extensão final 72°C – 10 min	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM – UFRJ)
	GES-R	CCGTGCTCAGGATGAGTTG				
	TEM-F	CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG	<i>bla</i> _{TEM}	650 pb		
	TEM-R	AACCAGCCAGCCWGAAGG				
	SHV-F	CTTGACCGCTGGGAAACGG	<i>bla</i> _{SHV}	200 pb		
	SHV-R	AGCACGGAGCGGATCAACGG				
	CTX-M 1/2-F	ATGTGCAGYACCAAGTAA	<i>bla</i> _{CTX-M-1/2}	876 pb		
	CTX-M 1/2-R	CGCTGCCGGTTTTATCSCCC				
	CTX-M 8-F	AACRCRCAGACGCTCTAC	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	512 pb		
	CTX-M 8-R	TCGAGCCGGAASGTGTAT				
CTX-M 9-F	GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	333 pb			
CTX-M 9-R	TTACAGCCCTTCGGCGATGA					
PCR multiplex AmpC plasmidial	CITM-F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	<i>bla</i> _{LAT} , <i>bla</i> _{CMY-2}	462 pb	Desnaturação 94°C – 3 min Desnaturação 94°C – 30 seg Anelamento 64°C – 30 seg Extensão 72°C – 1 min 25 ciclos Extensão final 72°C – 7 min	Perez-Perez; Hanson, 2002
	CITM-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC				
	DHAM-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	<i>bla</i> _{DHA}	405 pb		
	DHAM-R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC				
	ACCM-F	AACAGCCTCAGC AGCCGGTTA	<i>bla</i> _{ACC}	346 pb		
	ACCM-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC				
	EBCM-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	<i>bla</i> _{MIR} , <i>bla</i> _{ACT}	302 pb		
	EBCM-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT				
FOX-M-F	AACATGGGGTATCAGGGAGAG	<i>bla</i> _{FOX}	190 pb			
FOX-M-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG					

4.9 Caracterização Molecular

Para um agrupamento genético de clones de micro-organismos da mesma espécie foi utilizada a técnica de “*Random Amplified Polymorphic DNA*” (RAPD PCR) conforme metodologia proposta por Nielsen e colaboradores (2014). Foram utilizados dois iniciadores para cada amostra para a amplificação randômica: primer 1247 (AAGAGCCCGT) e primer 1283 (GCGATCCCCA). Foram preparadas duas soluções mãe, uma para cada iniciador. Cada reação de 25 µL continha água deionizada, solução Master Mix (GoTaq® Green Master Mix), 2 µM de primer e 2,5 µL da suspensão bacteriana.

As seguintes condições de ciclagem foram usadas para os iniciadores 1247 e 1283: desnaturação a 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 36°C (1247) / 38°C (1283) por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados oriundos dos isolados de mesma espécie foram analisados em gel de agarose a 2% (Inlab®) à 90 V, sem brometo de etídeo, até corrida alcançar 7,5 centímetros. A visualização dos géis sob luz ultravioleta (ImageQuant™ LAS 4000 GE Healthcare Life Science) e a fotodocumentação foram realizadas após corá-los e imergi-los em solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, por 30 minutos.

A similaridade genética foi medida pelo coeficiente de Jaccard (SJ) baseado na presença ou ausência de bandas como mesmo peso molecular utilizando o programa *Multi Variante Statistical Package 3.0* (MUSP 3.0 Kovach Computing Services, Wales, Reino Unido). Com base nos valores de SJ foram gerados dendrogramas pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) através do programa supracitado.

4.10 Análise Estatística

Para a análise descritiva dos dados foram utilizadas ferramentas de estatística básica com exposição através de tabelas e gráficos variados. Os resultados foram testados quanto à normalidade e, dependendo do resultado, testes paramétricos ou não paramétricos foram aplicados para comparação. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05\%$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tamanho da amostra e perfil epidemiológico dos hospitais

As amostras de bactérias Gram-negativas foram isoladas de leitos (estrutura lateral e colchão) e torneiras de ambos os hospitais incluídos no estudo. A proporção de leitos e torneiras coletadas em cada hospital está apresentada na tabela 4. Tanto no HUGV quanto no ICAM as torneiras foram as superfícies inanimadas com maior percentual de positividade.

Tabela 4: Proporção de leitos e torneiras coletadas de acordo com cálculos do programa OpenEpi. x índice de positividade

Hospital	Nº leitos ativos	Nº leitos coletados	Nº leitos positivos	Nº torneiras	Nº torneiras coletadas	Nº de torneiras positivas
HUGV	154	95	36 (37,89%)	72	56	40 (51,78%)
ICAM	124	83	47 (56,62%)	65	50	35 (70%)

Embora o grupo de Gram-negativos BGN-NF não seja foco do trabalho, é importante conhecer os números de micro-organismos que acercam os hospitais em estudo. Estes micro-organismos foram os mais associados a superfícies de torneiras, como esperado. Os BGN-NF são micro-organismos ubiqüitários no meio ambiente, inicialmente considerados como comensais e agora são importantes patógenos oportunistas e nosocomiais (JITENDRANATH et al., 2016).

O grupo de BGN-NF tem grande afinidade com água, eficientes na formação de biofilmes sobre superfícies úmidas e as torneiras de um modo geral apresentam em seu corpo um ambiente favorável para seu crescimento, entre várias bactérias (LARANJEIRA et al., 2010). A espécie de *P. aeruginosa* é uma espécie hidrofílica e a mais frequentemente

relacionada a torneiras. Devido a sua natureza oportunista pode ser isolada de infecções das mais diversas magnitudes em pacientes imunocomprometidos, sugerindo que em algumas situações possa ocorrer transmissão cruzada de torneiras colonizadas a pacientes hospitalizados (MURRAY et al., 2007; WANG et al., 2009).

Por outro lado, os membros da família *Enterobacteriaceae* constituem as bactérias isoladas com mais frequência de amostras clínicas, altamente eficientes na captação de inúmeros mecanismos de resistência a antimicrobianos (KONEMAN et al., 2012) e por isso foram objeto de estudo neste trabalho.

A partir da triagem dos Gram-negativos pela atividade da enzima citocromo oxidase e fermentação em ágar TSI constatou-se que houve o isolamento de 43 amostras de BGN-NF e 33 amostras de Enterobactérias, distribuídas em leitos e torneiras de enfermarias do HUGV, com total de 76 amostras. No entanto, muitas amostras de Enterobactérias não permaneceram viáveis para a continuação do trabalho e assim foram excluídas do estudo, restando 23 membros da família *Enterobacteriaceae*. O mesmo ocorreu com as amostras coletadas do ICAM, em que o estudo iniciou com 73 isolados de BGN-NF e 36 amostras de Enterobactérias, com 109 amostras. De 36 Enterobactérias, 33 amostras permaneceram viáveis até a conclusão do trabalho (gráfico 1).

Dos hospitais estudados, o maior número de Enterobactérias isolado das superfícies analisadas foi do ICAM, embora os números dessas superfícies sejam inferiores ao do HUGV. Comparativamente, as superfícies que permitiram maior número de isolamento de Enterobactérias em ambos os hospitais foram as estruturas laterais de leitos, seguidos das torneiras das enfermarias e os colchões de leitos (gráfico 1).

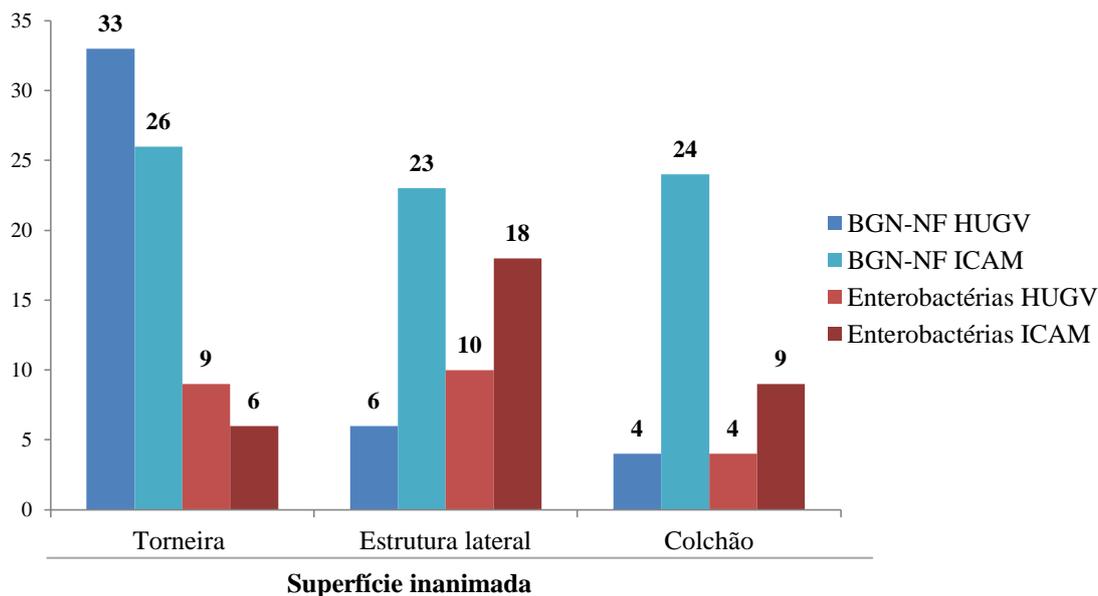


Gráfico 1: Relação de distribuição de Gram-negativos nas superfícies inanimadas dos hospitais HUGV e ICAM.

Os resultados encontrados acerca da prevalência de Enterobactérias em estruturas laterais de leitos assemelham-se com o trabalho descrito por Neto e colaboradores (2010), onde foi avaliada a frequência relativa de Enterobactérias coletadas de maçaneta, mesa de cabeceira e colchão das enfermarias de uma unidade de saúde de São Luís, Maranhão, em que houve maior prevalência desses micro-organismos em colchões, embora a referência supracitada não tenha enquadrado em seus estudos as estruturas laterais de leitos.

Por outro lado, apesar da existência de trabalhos sobre o isolamento de Enterobactérias em superfícies hospitalares poucos são os estudos sobre contaminação em estruturas laterais. O leito é o local onde o paciente passa mais tempo e as estruturas laterais são os locais mais tocados pelos próprios pacientes, visitantes, acompanhantes e profissionais de saúde. Estas estruturas são fundamentais para muitos procedimentos: servem de apoio para troca de lençóis de um leito ocupado com paciente, ajudam a aumentar a mobilidade e/ou estabilidade do paciente quando o paciente é movimentado da cama para uma cadeira de rodas, auxiliam como importante reservatório de patógenos nosocomiais, podendo ser transferidos a outros pacientes (POTTER; PERRY; ELKIN, 2013).

Em ambos os hospitais, as espécies do complexo *Enterobacter cloacae* (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* e *Enterobacter kobei*) foram as mais prevalentes, com 10 isolados do complexo no HUGV e 11 isolados no ICAM. As espécies do complexo *Enterobacter cloacae* são subdivididas dessa forma devido aos estudos bioquímicos e moleculares apresentarem uma heterogeneidade genômica, confundindo muitos sistemas comerciais de identificação. Essas espécies são habitualmente associadas ao ambiente, podendo ainda ser encontradas em alimentos. As infecções por *Enterobacter* são associadas à contaminação de dispositivos e instrumentos médicos, consideradas assim como importantes patógenos nosocomiais, estando entre os micro-organismos mais associados a bacteremia e septicemias (MURRAY et al., 2007)

A segunda espécie de Enterobactéria mais prevalente foi *Klebsiella pneumoniae* com 4 amostras no HUGV e 9 no ICAM. Embora seja encontrada no trato gastrointestinal de forma comensal, podendo ser ainda encontradas em fezes, *K. pneumoniae* é frequentemente associada a surtos de pneumonia, infecções de corrente sanguíneas, feridas cirúrgicas e meningite e é facilmente propagada via mãos de profissionais de saúde ao manejar pacientes infectados, podendo transmitir a outros pacientes e também pela contaminação do ambiente hospitalar através de superfícies inanimadas (www.cdc.gov/HAI/organisms).

Outros micro-organismos recuperados do HUGV e ICAM estão representados nos gráficos 2 e 3, respectivamente.

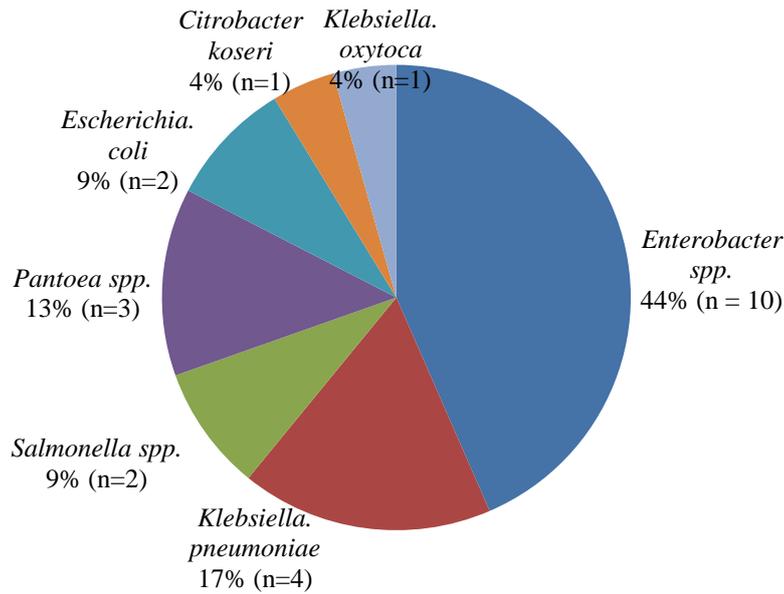


Gráfico 2: Relação de espécies de Enterobactérias isoladas do HUGV

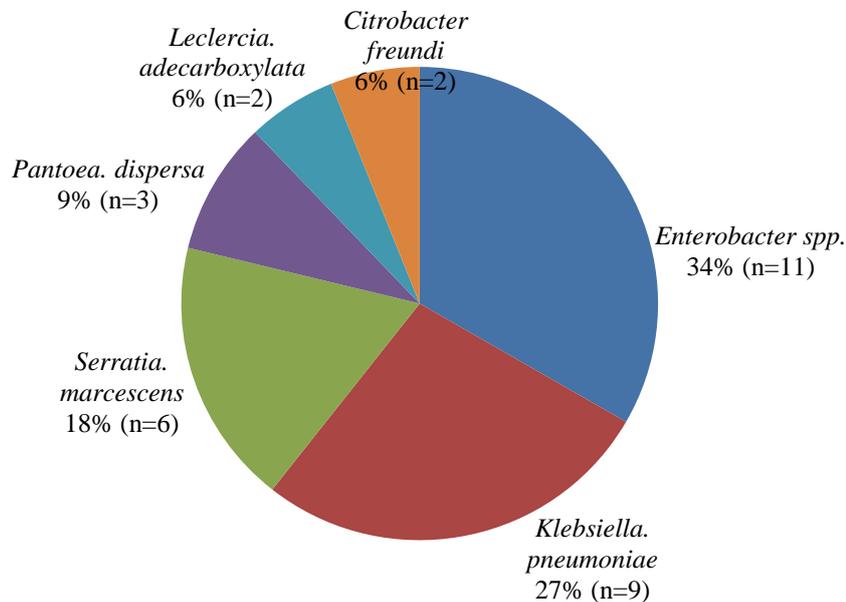


Gráfico 3: Relação de espécies de Enterobactérias isoladas do ICAM

A respeito da contaminação do ambiente hospitalar por micro-organismos, a maior parte dos estudos de revisão detalha a prevalência de espécies de *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Clostridium difficile*, *S. aureus* resistente a meticilina e *Enterococcus* resistente a vancomicina em superfícies inanimadas, em que pacientes que são internados em instalações contaminadas por essas espécies são 70% mais suscetíveis a adquirir estes patógenos durante

sua internação. Em menor proporção há trabalhos citando a presença de *K. pneumoniae*, isoladas de estruturas laterais, pias, mesas e maçanetas (GALVIN et al., 2012; CREAMER; HUMPHREYS, 2008). Essa propagação de patógenos nosocomiais está diretamente relacionada à falta de boas práticas de higiene no ambiente hospitalar (DANCER; WHITE; ROBERTSON, 2008).

As tabelas 5 e 6 retratam o perfil epidemiológico e distribuição de micro-organismos de cada hospital. É importante ressaltar que para cada superfície podem ter sido isolados mais de um tipo de micro-organismo e em algumas ocasiões o mesmo micro-organismo esteve presente em mais de um tipo de superfície da mesma enfermaria.

Tabela 5: Distribuição de Enterobactérias recuperadas de superfícies inanimadas do HUGV

Código	Espécie	Sítio recuperado	Enfermaria	Clínica
HUGV - 6	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	Enfermaria 1	Médica
HUGV - 7	<i>Salmonella</i> sp.	Torneira	Enfermaria 1	Médica
HUGV - 8	<i>Salmonella</i> sp.	Colchão	L. 90	Médica
HUGV - 26	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 102	Médica
HUGV - 27	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 104	Médica
HUGV - 28	<i>P. anatis</i>	Estrutura lateral	L. 119	Médica
HUGV - 30	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 113	Médica
HUGV - 44	<i>C. koseri</i>	Torneira	Salão	CTI
HUGV - 51	<i>E. coli</i>	Colchão	L. 69	Ortopedia
HUGV - 53	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	L. 88	Ortopedia
HUGV - 54	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 89	Ortopedia
HUGV - 58	<i>E. asburiae</i>	Torneira	Enf. Masculina 2	Ortopedia
HUGV - 60	<i>E. cloacae</i>	Torneira	Enf. Feminina	Ortopedia
HUGV - 62	<i>E. kobei</i>	Torneira	Enf. Feminina	Ortopedia
HUGV - 63	<i>E. cloacae</i>	Torneira	Enf. Pediátrica	Ortopedia
HUGV - 64	<i>K. oxytoca</i>	Torneira	Enf. Pediátrica	Ortopedia
HUGV - 70	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	L. 31	Cirúrgica
HUGV - 71	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	Enfermaria 3	Cirúrgica
HUGV - 78	<i>P. agglomerans</i>	Estrutura lateral	L. 112	Cirúrgica
HUGV - 87	<i>E. asburiae</i>	Colchão	L. 29	Cirúrgica
HUGV - 89	<i>P. agglomerans</i>	Estrutura lateral	L. 29	Cirúrgica
HUGV - 91	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 37	Cirúrgica
HUGV - 98	<i>E. coli</i>	Colchão	L. 06	Cirúrgica

Abreviatura: L, leito; Enf, enfermaria; CTI, Centro de Terapia Intensiva.

Tabela 6: Distribuição de Enterobactérias recuperadas de superfícies inanimadas do ICAM

Código	Espécie	Sítio recuperado	Enfermaria	Andar	Clínica
ICAM - 1	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	L. 20	Térreo	SI
ICAM - 3	<i>K. pneumoniae</i>	Colchão	L. 20	Térreo	SI
ICAM - 12	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	Banheiro, Enf.3	Térreo	Pediatria
ICAM - 14	<i>E. asburiae</i>	Estrutura lateral	L. 46, Enf. 3	Térreo	Pediatria
ICAM - 17	<i>K. pneumoniae</i>	Colchão	L. 57, Enf. 2	Térreo	Pediatria
ICAM - 18	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	Banheiro, Enf.2	Térreo	Pediatria
ICAM - 20	<i>S. marcescens</i>	Torneira	Enfermaria 4	Térreo	Pediatria
ICAM - 22	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 66, Enf. 1	Térreo	Pediatria
ICAM - 23	<i>E. cloacae</i>	Torneira	Enfermaria 1	Térreo	Pediatria
ICAM - 31	<i>E. asburiae</i>	Estrutura lateral	L. 38, Enf. 2	Térreo	Cirúrgica
ICAM - 34	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	Banheiro, Enf.3	Térreo	Cirúrgica
ICAM - 39	<i>S. marcescens</i>	Estrutura lateral	L. 29, Enf. 2	Térreo	Cirúrgica
ICAM - 40	<i>P. dispersa</i>	Estrutura lateral	L. 31, Enf. 2	Térreo	Cirúrgica
ICAM - 57	<i>E. cloacae</i>	Colchão	L. 89	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 62	<i>P. dispersa</i>	Estrutura lateral	L. 89	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 73	<i>S. marcescens</i>	Estrutura lateral	L. 111	3º andar	Enfermaria 3
ICAM - 86	<i>E. coli</i>	Colchão	L. 120	3º andar	Enfermaria 5
ICAM - 93	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	L. 116	3º andar	Enfermaria 4
ICAM - 99	<i>E. cloacae</i>	Colchão	L. 118	3º andar	Enfermaria 5
ICAM - 112	<i>C. freundii</i>	Estrutura lateral	L. 18	Térreo	SI
ICAM - 117	<i>E. cloacae</i>	Estrutura lateral	L. 21	Térreo	SI
ICAM - 126	<i>E. cloacae</i>	Colchão	L. 21	Térreo	SI
ICAM - 130	<i>K. pneumoniae</i>	Colchão	L. 75	2º andar	Enfermaria 2
ICAM - 132	<i>S. marcescens</i>	Estrutura lateral	L. 75	2º andar	Enfermaria 2
ICAM - 133	<i>S. marcescens</i>	Colchão	L. 75	2º andar	Enfermaria 2
ICAM - 135	<i>E. asburiae</i>	Torneira	Salão	2º andar	Enfermaria 2
ICAM - 138	<i>L. adecarboxylata</i>	Estrutura lateral	L. 91	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 139	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	L. 91	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 146	<i>C. freundii</i>	Estrutura lateral	L. 90	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 148	<i>E. asburiae</i>	Estrutura lateral	L. 90	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 149	<i>E. asburiae</i>	Colchão	L. 90	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 156	<i>P. dispersa</i>	Estrutura lateral	L. 88	2º andar	Enfermaria 5
ICAM - 160	<i>L. adecarboxylata</i>	Estrutura lateral	L. 109	3º andar	Enfermaria 3

Abreviatura: L, leito; Enf, enfermaria; SI, semi-intensiva.

Notoriamente, duas amostras de *Salmonella* sp. foram recuperadas do HUGV (tabela 5), sendo uma amostra isolada de torneira da enfermaria 1 da clínica médica (HUGV-7) e outra foi isolada do leito 90, da mesma enfermaria e clínica (HUGV-8). Espécies de

Salmonella são habitantes naturais do intestino de animais inferiores (aves domésticas, bovinos, suínos) e podem ser isoladas de água ou alimentos contaminados com fezes, sobrevivendo por um longo período de tempo, talvez por anos no ambiente. As infecções pelo gênero *Salmonella* são mais comumente causadas pela ingestão de alimentos, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais. Nos Estados Unidos, cerca da metade das epidemias de salmoneloses resulta de aves domésticas e produtos contaminados dessas aves (KONEMAN et al., 2012; MURRAY et al., 2007).

Em um estudo publicado no ano de 1991 por Hammami, Arlet e Ben Redjeb, foi constatada a contaminação cruzada de um sorotipo de *Salmonella* em uma unidade neonatal de terapia intensiva de um hospital da Tunísia, onde 27 recém-nascidos apresentavam sinais de gastroenterite aguda. No estudo foram coletadas amostras de 264 recém-nascidos, 72 swabs de colchão das incubadoras e 51 amostras de fezes da equipe médica. Como resultado, todos os isolados obtidos das culturas de fezes tiveram o mesmo padrão de resistência aos antimicrobianos e o micro-organismo foi recuperado também de colchão de incubadora e de uma das amostras de fezes de uma enfermeira, indicando a provável fonte de contaminação.

Da mesma forma, no presente estudo as duas amostras de *Salmonella* sp. coletadas de torneira e colchão apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (anexo), com resistência apenas à cefalotina e provavelmente tratam-se do mesmo tipo bacteriano, sugerindo que o micro-organismo presente no colchão seja proveniente da amostra presente na torneira, significando assim uma possível fonte de contaminação para o paciente acamado no leito ao qual pertence o colchão colonizado pelo micro-organismo.

Não obstante, outro isolado que merece discussão é a *E. coli* recuperada de colchões de leitos tanto do HUGV (HUGV-51 e HUGV-58) quanto do ICAM (ICAM-86). Pelo fato de se tratar de espécies ubiqüitárias em fezes de animais e humanos, a presença de *E. coli* no

ambiente é considerada um indicador de contaminação fecal (MURRAY et al., 2007), sugerindo assim a provável contaminação da superfície por material fecal.

Essa proporção de contaminação do ambiente hospitalar pode ser decorrente de inúmeros fatores, como já discutidos. Galvin e colaboradores (2012) sugerem que a circulação nas enfermarias no período da manhã, quando se iniciam as atividades rotineiras como administração de medicamentos, troca de curativos, asseio diário de pacientes, podem influenciar na colonização do ambiente por potenciais patógenos. Partículas de poeira podem abrigar a pele de pacientes, como *S. aureus*; a frequência do uso de um único banheiro na enfermaria para pacientes e acompanhantes pode facilitar a propagação de *C. difficile* e *E. coli* produtora de ESβL e há um aumento da detecção destes micro-organismos no ambiente em períodos de visitas e intervalos de lanches.

Pode-se considerar que as condições dos hospitais brasileiros favorecem o cenário da colonização do ambiente por potenciais patógenos. A alta rotatividade dos hospitais em seus leitos e as condições precárias de higiene e descontaminação e a necessidade de serem ocupados logo após a sua vacância, refletem uma limpeza terminal incorreta que favorece o amplo crescimento de micro-organismos que podem ser propagados aos pacientes internados (NETO et al., 2010), necessitando assim de melhor atenção das autoridades de saúde para enfatizar a monitorização da transmissão de patógenos ao ambiente.

5.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

A sensibilidade das amostras de enterobactérias aos diversos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão. A partir dos gráficos 5 e 6 observa-se o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados de todas as amostras de Enterobactérias estudadas de ambos os hospitais.

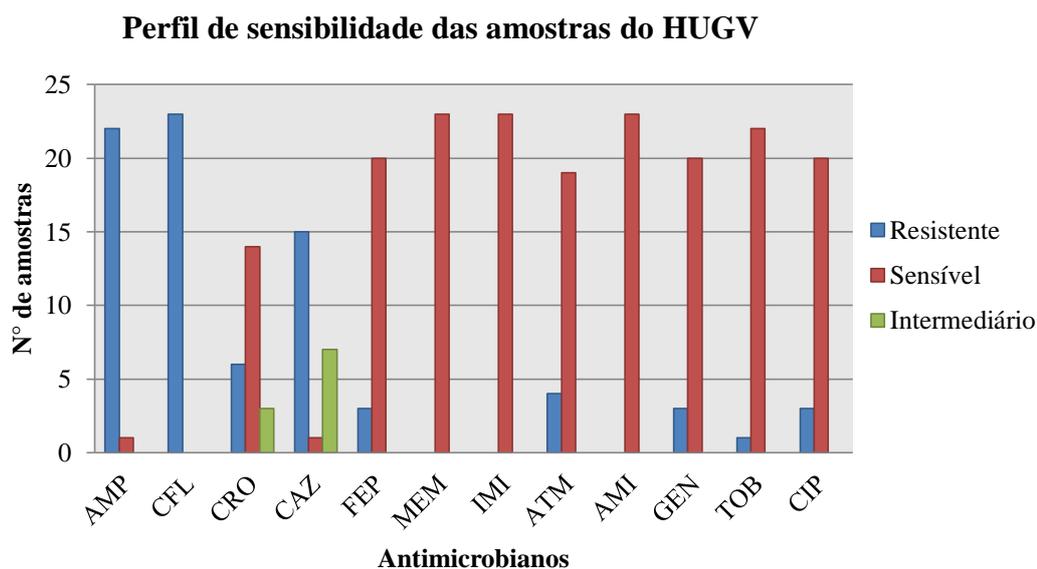


Gráfico 4: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias recuperadas do HUGV. AMP, ampicilina; CFL, cefalotina; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; MEM, meropenem; IMI, imipenem; ATM, aztreonam; AMI, ampicilina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina e CIP, ciprofloxacino.

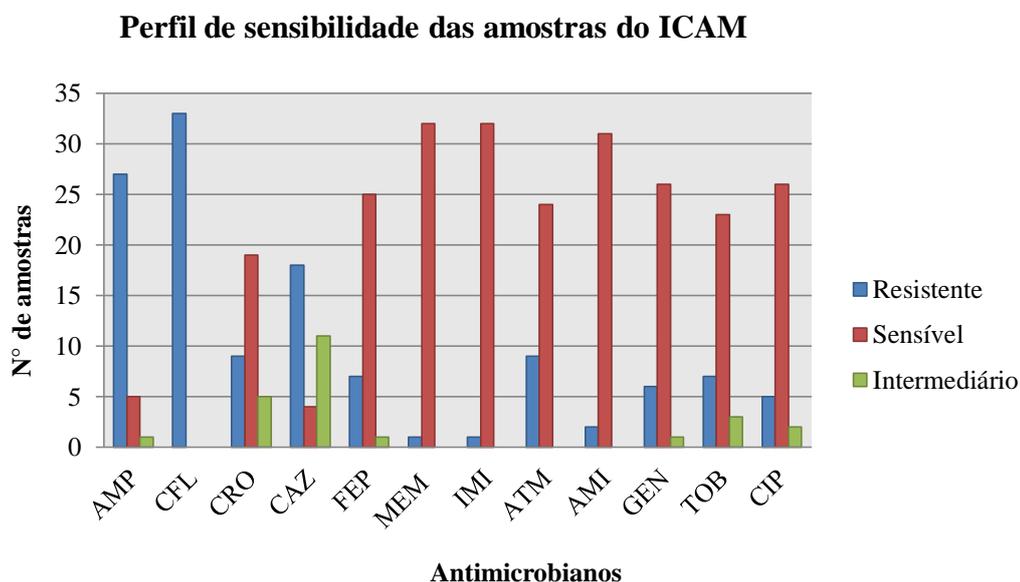


Gráfico 5: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias recuperadas do ICAM. AMP, ampicilina; CFL, cefalotina; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; MEM, meropenem; IMI, imipenem; ATM, aztreonam; AMI, ampicilina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina e CIP, ciprofloxacino.

A partir do teste de sensibilidade, à exceção da amostra HUGV – 98, que corresponde a um isolado de *E. coli*, observa-se que todas as amostras de enterobactérias do HUGV foram resistentes a ampicilina e à cefalotina. Este perfil aponta que as amostras do HUGV

provavelmente possuem genes codificadores de enzimas β -lactamases de espectro restrito, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1, nas quais essas enzimas apresentam espectro de ação contra penicilinas naturais e semi-sintéticas, como ampicilina, amoxicilina, e contra cefalosporinas de 1ª geração, como cefalotina, cefazolina e cefalexina.

Segundo Ghafourian e colaboradores (2014), a resistência a ampicilina é mediada pela produção da enzima SHV-1 pelos plasmídeos de bactérias e TEM-1 e TEM-2 são responsáveis pela hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração, frequentes em espécies de Enterobactérias. No entanto, métodos moleculares para amplificação de genes codificadores das enzimas citadas seriam necessários para a confirmação da hipótese.

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias do ICAM foi semelhante ao observado às enterobactérias do HUGV, em que 5 amostras foram sensíveis à ampicilina e todos os 33 isolados foram resistentes à cefalotina, indicando que provavelmente ao menos as enzimas de espectro restrito também sejam codificados pelos plasmídeos dessas amostras.

De todas as amostras avaliadas de ambos os hospitais, apenas um isolado de *K. pneumoniae* (ICAM-12) apresentou resistência aos carbapenêmicos meropenem e imipenem, além de ter apresentado espectro de ação contra mais seis antibióticos: ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, aztreonam e ciprofloxacino, sugerindo que além de possuir genes codificadores de ES β L (pela inibição de cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações), pode possuir também genes codificadores de carbapenemases, devendo ser confirmados por métodos moleculares. A amostra em questão foi recuperada de uma torneira da clínica pediátrica do instituto.

Os isolados HUGV – 70 e HUGV- 71, ambos espécies de *K. pneumoniae* apresentaram o mesmo perfil de resistência pela técnica de disco-difusão, com inibição da atividade *in vitro* da ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime e aztreonam. As

duas amostras foram recuperadas de sítios diferentes (estrutura lateral e torneira), mas ambos da mesma clínica, o que indica que houve transmissão cruzada dessas superfícies. O estudo realizado por Wolf e colaboradores (2014) demonstrou a presença de ESβL em pias de CTI, apontando-as como fontes de contaminação. Nesse estudo foi discutido que quatro pacientes foram colonizados por bactérias produtoras de ESβL idênticas às encontradas na pia, uma vez que as pias tinham sido contaminadas antes de o paciente ter sido admitido ao CTI. Um dos pacientes foi a óbito devido a uma infecção de por *E. cloacae* produtor de ESβL.

Apesar de o nosso estudo não trabalhar diretamente com pacientes, nem mesmo com prontuários de pacientes, não há possibilidade de fazer correlações de infecção de pacientes internados sugerindo que a contaminação provenha de superfícies inanimadas. No entanto, os resultados dos testes de sensibilidade encontrados em nosso estudo reforçam tal possibilidade, intensificando a necessidade de melhorias nas práticas de detecção e sanitização.

Notadamente, observando os gráficos 4 e 5, as amostras isoladas do ICAM apresentaram-se como mais resistentes aos antimicrobianos testados que as amostras do HUGV. As espécies mais resistentes do HUGV foram *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, com resistência igual ou superior a cinco antimicrobianos testados; e as mais sensíveis foram *Salmonella* spp., *E. cloacae*, *C. koseri* e *E. coli*, com resistência a dois antimicrobianos ou menos.

As espécies mais resistentes do ICAM foram *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *C. freundii* e *E. asburiae*, ao passo que as mais sensíveis foram *E. asburiae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Pantoea dispersa*, *E. cloacae*, *C. freundii* e *L. adecarboxylata*. Nos dois hospitais foi avaliado que a resistência aos antimicrobianos testados foi maior para ampicilina, cefalotina e ceftazidima, e a sensibilidade foi maior para os carbapenêmicos, amicacina e tobramicina (gráficos 4 e 5).

Os halos de inibição do teste de disco-difusão para avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos encontra-se na seção de anexo deste trabalho.

5.3 Avaliação fenotípica de produção de ESβL e carbapenemases

Do total de 23 amostras de Enterobactérias recuperadas das superfícies do HUGV, 5 (21,73%) foram triadas como produtoras de ESβL pela metodologia de disco-aproximação (figuras 9 e 10). A relação das amostras positivas para o teste é observada na tabela 7.

Tabela 7: Relação de isolados positivos em disco aproximação, sítio de recuperação e perfil de resistência a antimicrobianos do HUGV.

Código	Espécie	Sítio de recuperação	Perfil de Resistência (disco-difusão)
HUGV – 53	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM
HUGV – 58	<i>E. asburiae</i>	Torneira	AMP, CFL, CRO
HUGV – 64	<i>K. oxytoca</i>	Torneira	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM
HUGV – 70	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM
HUGV – 71	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM

Abreviatura: AMP, ampicilina; CEF, cefalotina; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; e ATM, aztreonam.

De acordo com os resultados aplicados na tabela 7, verifica-se que as amostras em questão apresentaram resistência a pelo menos 5 antibióticos pelo teste de disco-difusão, corroborando com o teste de disco-aproximação e indicando que além de apresentar enzimas de espectro restrito, provavelmente possuem enzimas de espectro estendido.

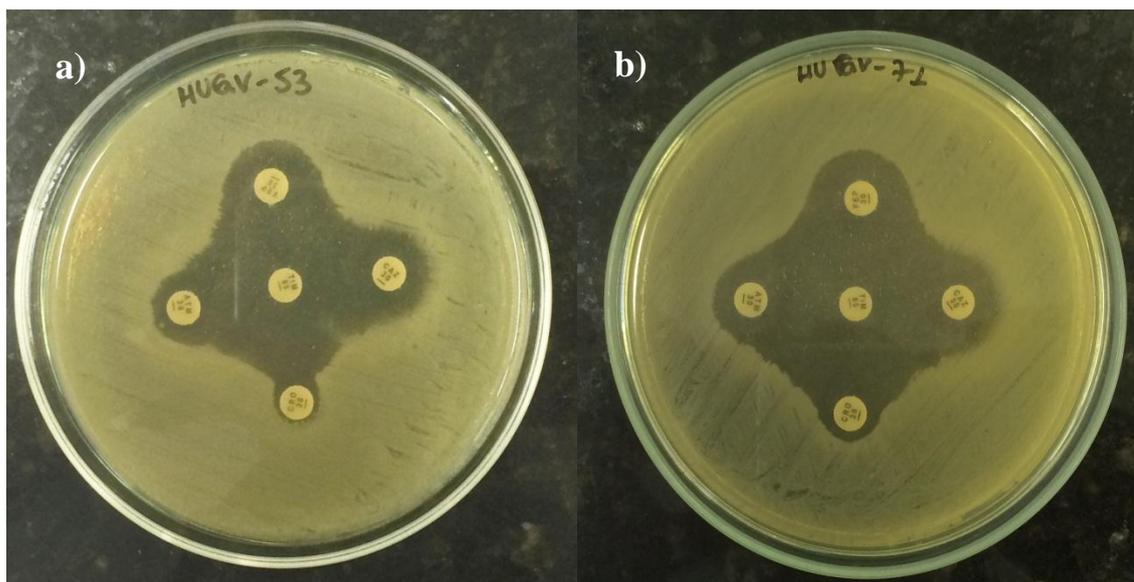


Figura 9: Teste fenotípico por disco aproximação para detecção de ES β L das amostras do HUGV. a) *K. pneumoniae* (HUGV-53) e *K. pneumoniae* (HUGV-71).

Considera-se ainda que das 5 amostras positivas para o teste fenotípico, 3 correspondem à espécie de *K. pneumoniae*, distribuídas em estruturas laterais e torneiras. No estudo realizado por Cholley e colaboradores (2013), que avaliaram a transmissão cruzada entre superfícies hospitalares e pacientes por *E.coli* e *K. pneumoniae* produtores de ES β L em diferentes períodos do ano, os autores avaliaram que houve maior frequência de transmissão cruzada de *K. pneumoniae* comparada a *E. coli*.

Tal frequência foi associada às estações do ano, onde concluíram que o verão é uma época de alto risco para surtos de infecções hospitalares especialmente por Enterobactérias, nas quais a frequência é justificada pelo fato de as soluções hidroalcoólicas para limpeza serem muito fracas devido à alta umidade residual nos períodos quentes. Associada a esta hipótese, considera-se que o clima da região Amazônica é quente e úmido, o que portanto favorece a propagação de micro-organismos resistentes a pacientes internados.

Com relação ao ICAM, de 33 Enterobactérias, 9 (27,27%) foram triadas como positivas para produção de ES β L pelo teste fenotípico de disco aproximação. A relação de amostras positivas é apresentada na tabela 8.

Tabela 8: Relação de isolados positivos em disco aproximação, sítio de recuperação e perfil de resistência a antimicrobianos do ICAM.

Código	Espécie	Sítio de recuperação	Perfil de Resistência (disco-difusão)
ICAM – 3	<i>K. pneumoniae</i>	Colchão	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, TOB, CIP
ICAM – 12	<i>K. pneumoniae</i>	Torneira	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, MEM, IMI, ATM, CIP
ICAM – 57	<i>E. cloacae</i>	Colchão	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, TOB
ICAM – 86	<i>E. coli</i>	Colchão	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, AMI, GEN, TOB, CIP
ICAM – 93	<i>K. pneumoniae</i>	Estrutura lateral	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM, GEN, TOB, CIP
ICAM – 130	<i>K. pneumoniae</i>	Colchão	AMP, CFL, CRO, CAZ
ICAM – 146	<i>C. freundii</i>	Estrutura lateral	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB, CIP
ICAM – 148	<i>E. asburiae</i>	Estrutura lateral	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB
ICAM – 149	<i>E. asburiae</i>	Colchão	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB

Abreviatura: AMP, ampicilina; CFL, cefalotina; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; MEM, meropenem; IMI, imipenem; ATM, aztreonam; AMI, amicacina; GEN, gentamicina, TOB, tobramicina; e CIP, ciprofloxacino.

De acordo com os dados apresentados na tabela 8, a técnica de disco aproximação realizada com as amostras do instituto confirma o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do instituto obtido pela técnica de disco-difusão, considerando essas amostras como potenciais produtoras de ES β L, confirmando assim que os isolados do ICAM são mais resistentes que os isolados do HUGV.

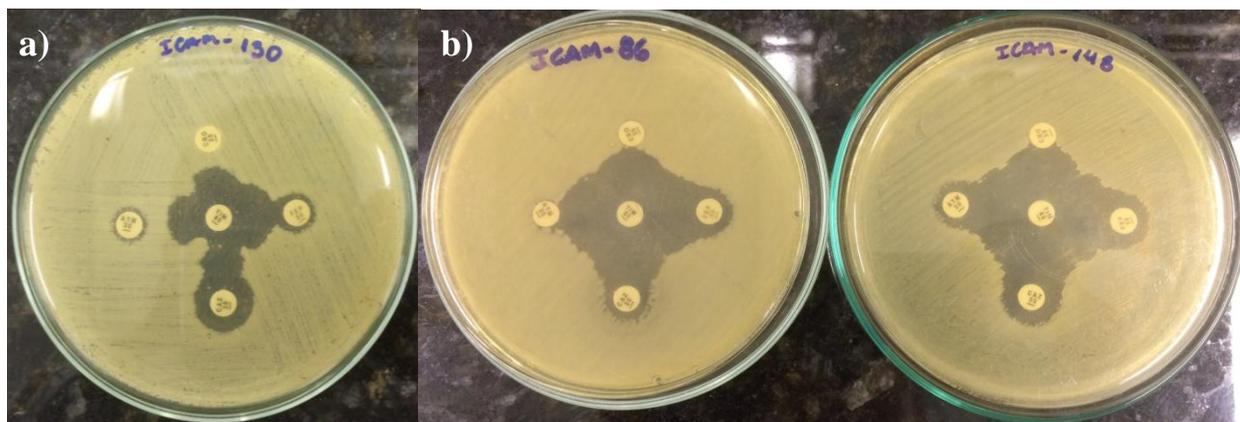


Figura 10: Teste fenotípico por disco aproximação para detecção de ES β L das amostras do ICAM. a) *K. pneumoniae* (ICAM-130), b) *E. coli* (ICAM-86) e c) *E. asburiae* (ICAM-148).

Assim como no HUGV, as amostras do ICAM triadas pelo teste de disco aproximação também corresponderam em maior parte a isolados de *K. pneumoniae*. Ainda, observa-se ainda que as amostras produtoras de ESβL foram isoladas em maior proporção de colchões de leitos, seguidos de estrutura lateral e torneiras.

Apesar de a maioria dos estudos sobre micro-organismos resistentes em colchões se tratar de contaminação por MRSA, VRE, *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. (OLIVEIRA; VIANA; DAMASCENO, 2013), o perfil de distribuição dos isolados produtores de ESβL do ICAM assemelham-se com o trabalho desempenhado por Freeman e colaboradores (2014), em que encontram a prevalência de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESβL em superfícies próximas à cama de pacientes: mesa pessoal e lençol de cama, mesmo que não tenhamos realizado o estudo com outras superfícies inanimadas, nem enquadrado outros grupos de micro-organismos.

Embora não sejam considerados como superfície inanimada não crítica, que tem contato apenas com a pele intacta e não com mucosas, os leitos hospitalares, incluindo os colchões, por meio do contato direto com o paciente tornam-se contaminados por micro-organismos resistentes que colonizam a pele, por fluidos corporais como fezes, urinas, exsudados de feridas, tornando-se um potencial reservatório de micro-organismos e contribui dessa forma para a transmissão horizontal a outras superfícies e pacientes (OLIVEIRA; VIANA; DAMASCENO, 2013).

No estudo realizado por Dziri e colaboradores (2016) sobre a detecção de ESβL produzidas por *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Citrobacter* encontradas em ambiente hospitalar na Tunísia, foi avaliado que um mesmo clone de *K. pneumoniae* detectado em diferentes sítios (maçaneta, mesa sobre a cama e lençóis) em duas unidades diferentes foi detectado também na mão de um paciente, evidenciando que a propagação foi facilitada pela contaminação

cruzada (via mãos). Em nosso estudo, o mesmo resultado foi observado para *E. cloacae*, mostrando a eficiência de um único clone se disseminando a diferentes áreas do hospital.

Neste trabalho encontramos dois isolados de *E. asburiae* (ICAM-148 e ICAM-149), que foram isolados de um mesmo leito (leito 90 da enfermaria 5, 2º andar do ICAM) na qual um isolado foi obtido de estrutura lateral e outro isolado do colchão. As duas amostras foram triadas como produtoras de ESβL pelo teste de disco aproximação e apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados por disco-difusão. Ao que indica, estes isolados são do mesmo clone de *Enterobacter* e assim como o estudo citado anteriormente, evidencia a eficiência da fácil propagação, podendo comprometer a saúde do paciente em eventual situação de colonização/infecção por este micro-organismo.

Ressalta-se também a presença da espécie de *E. coli* produtora de ESβL em colchão (ICAM-86), com resistência a 10 dos 12 antimicrobianos testados. Mesmo que a amostra não tenha apresentado resistência aos dois carbapenêmicos do estudo, pelo perfil de resistência obtido pode-se apontar a espécie como multirresistente. É importante lembrar que a espécie é utilizada como indicador de contaminação fecal, sugerindo que a contaminação do colchão tenha sido de origem fecal, ou, em outras proporções, oriunda de espécime clínico de um paciente com outro tipo de infecção pela bactéria, como infecção urinária ou septicemia.

A partir do teste de Carba NP, um único isolado de todas as amostras deste estudo foi positivo para produção de carbapenemase. A amostra ICAM-12, uma *K. pneumoniae*, isolada de torneira, apresentou pelo teste de disco-difusão perfil de resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem, além de apresentar resistência às cefalosporinas de 1ª, 3ª e 4ª gerações, aztreonam, tobramicina e ciprofloxacino.

A figura 11 representa o teste fenotípico de Carba NP, em que foram utilizados dois padrões diferentes de controle positivo: um para produção de NDM, uma enzima do tipo MβL, e outro para produção de KPC, uma serino-carbapenemase. A amostra ICAM-12 exibiu

o mesmo padrão do controle positivo para produção de KPC, uma vez que os poços 2 e 3 tiveram coloração amarela, indicando a presença da enzima pela acidificação nos dois meios reacionais e por não terem sido inibidas por EDTA, como ocorre com serino-carbapenemases.

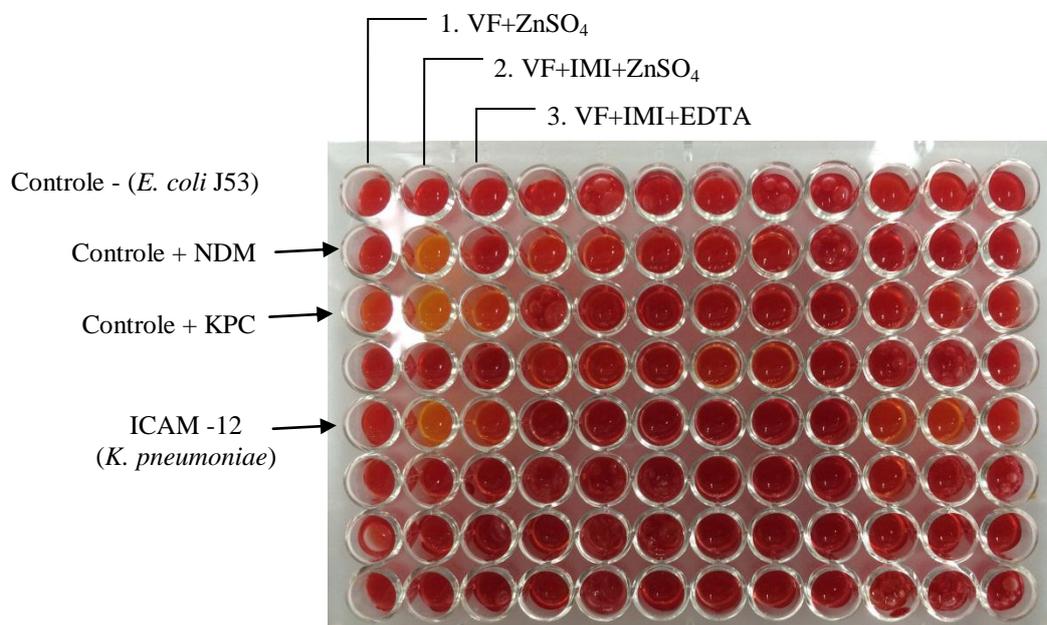


Figura 11: Detecção fenotípica de carbapenemases pelo teste de Carba NP. VF, vermelho de fenol; e IMI, imipenem.

A maior parte dos estudos a respeito da contaminação do ambiente hospitalar por micro-organismos relatam a presença de produção de enzimas ES β L. Cunha e colaboradores (2016), no entanto realizaram o trabalho de triagem de superfícies inanimadas em um asilo para pesquisa de Enterobactérias produtoras de carbapenemases (CRE). Neste estudo, entre tantas superfícies coletadas, os autores constataram a presença de CRE em sondas nasogástricas, na qual o material serviu como fômite para propagação de CRE para as torneiras de enfermarias que podem ter sido contaminadas no momento do preparo da sonda.

Este estudo reforça, portanto as reais possibilidades que as torneiras têm como fômites de propagação de micro-organismos resistentes, visto que são utilizadas para a lavagem e higienização de muitos materiais de uso do paciente, além de seu manuseio para práticas de higiene pessoal, como escovação dos dentes e asseios de pacientes acamados.

5.4 Identificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e multiplex

Os isolados identificados como produtores de β -lactamases e carbapenemases pelos métodos fenotípicos foram submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase convencional e multiplex para confirmação da produção das enzimas. Ao total, foram avaliados pelos métodos moleculares 5 amostras do HUGV e 9 amostras do ICAM. De todos os genes codificadores de carbapenemases pesquisados (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}), houve apenas a detecção do gene *bla*_{KPC} em um único isolado, ICAM-12. Este isolado foi detectado fenotipicamente por Carba NP como produtor de KPC.

Dentre os genes codificadores de β -lactamases (*bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1/2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-9}), os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} apresentaram amplicons em quase todas as amostra, assim como pelo menos uma variante de *bla*_{CTX-M}. Dos genes codificadores de AmpC avaliados (*bla*_{LAT}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{MIR} e *bla*_{ACT}, *bla*_{FOX}), houve anelamento com os primers específicos para as famílias CMY-2 e LAT e anelamento com os primers específicos para as famílias MIR e ACT.

Na tabela 9 estão apresentados os genes detectados para codificação das enzimas. Com esses dados, observa-se que a maior parte dos isolados são, em suma, espécies de *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. Estes micro-organismos têm sido frequentemente associados como produtores de enzimas de espectro de ação contra inúmeros antimicrobianos, isolados de diversas superfícies inanimadas hospitalares (DZIRI et al., 2016; LEITNER et al., 2015).

Tabela 9: Perfil molecular dos isolados identificados como produtores de β -lactamases e carbapenemases pelos métodos fenotípicos

Código	Espécie	Perfil de Resistência	Gene codificador
HUGV – 53	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM	TEM; SHV; CTX-M-1/2
HUGV – 58	<i>E. asburiae</i>	AMP, CFL, CRO	TEM; CTX 1/2, CTX-M-8
HUGV – 64	<i>K. oxytoca</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM	TEM; SHV
HUGV – 70	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM	TEM; SHV; CTX-M-1/2
HUGV – 71	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM	TEM; SHV; CTX-M-1/2
ICAM – 3	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, TOB, CIP	SHV; CTX-M-1/2
ICAM – 12	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, MEM, IMI, ATM, CIP	SHV; CTX-M-1/2; KPC
ICAM – 57	<i>E. cloacae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, TOB	TEM; CTX-M-1/2
ICAM – 86	<i>E. coli</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, AMI, GEN, TOB, CIP	TEM; SHV; CTX-M-1/2; CTX-M-8
ICAM – 93	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, ATM, GEN, TOB, CIP	CTX 1,2; SHV
ICAM – 130	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ	TEM; SHV; CTX-M-1/2
ICAM – 146	<i>C. freundii</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB, CIP	TEM; CTX-M-1/2; LAT/CMY-2
ICAM – 148	<i>E. asburiae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB	TEM; CTX-M-1/2; MIR/ACT
ICAM – 149	<i>E. asburiae</i>	AMP, CFL, CRO, CAZ, FEP, ATM, GEN, TOB	TEM; CTX-M-1/2; MIR/ACT

Abreviatura: AMP, ampicilina; CEF, cefalotina; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; MEM, meropenem; IMI, imipenem; ATM, aztreonam; AMI, ampicacina; GEN, gentamicina, TOB, tobramicina; e CIP, ciprofloxacino.

O perfil molecular das enzimas detectadas como produtoras de β -lactamases e carbapenemases correspondem ao seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos obtidos por disco-difusão. O número de enzimas encontrado está apresentado no gráfico 6.

Todas as amostras do ICAM que apresentaram genes de codificação para enzimas TEM e SHV, foram avaliadas também como produtoras de CTX-M-1/2. No entanto, não se sabe ao certo as variantes das enzimas TEM e SHV e estudos de sequenciamento são

necessários a fim de diferenciar a variante, possibilitando assim identificar se as enzimas TEM e SHV detectadas são enzimas de espectro restrito ou estendido (ESβL).

Pelo perfil de sensibilidade a antimicrobianos apresentado na tabela 9, todas as amostras do ICAM foram sensíveis a, pelo menos, penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações. As penicilinas de 3ª geração fogem do perfil de substratos das enzimas SHV e TEM de espectros restritos, que tem atividade para penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração, apenas. Ao que indica, a resistência aos antibióticos identificados é mediada pela atividade da enzima CTX-M-1/2, que é uma ESβL, e possivelmente as variações de SHV e TEM tratam-se de β-lactamases de espectro restrito.

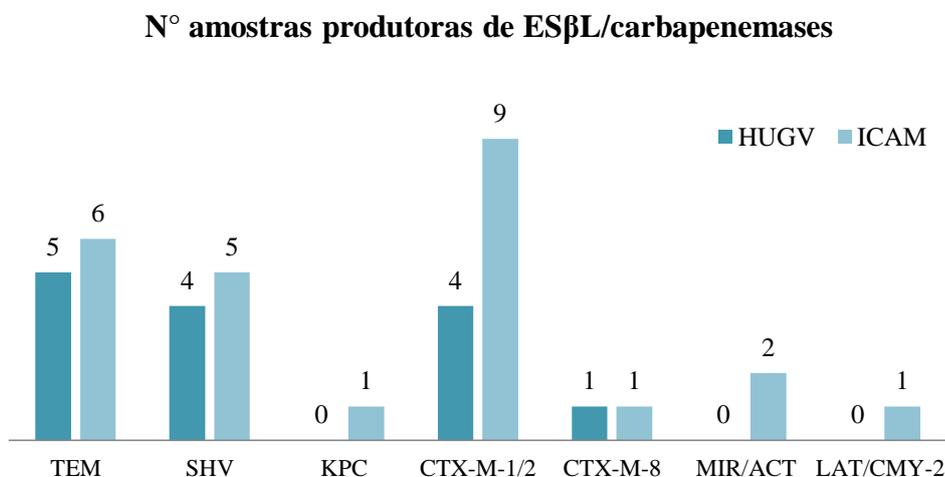


Gráfico 6: Distribuição de enzimas detectadas nos hospitais estudados

A mesma observação é feita para as amostras do HUGV, em que apresentaram genes de codificação para TEM, SHV e CTX-M-1/2. A única exceção é para a amostra HUGV-64, que é uma espécie de *K.oxytoca* e amplificou genes de codificação apenas para TEM e SHV. Pelo método de disco-difusão verificou-se que essa amostra possui resistência a penicilina, cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações e ao aztreonam. Com esse espectro de atividade, pode-se inferir que a amostra possui genes de codificação de enzimas não associados a espectro

restrito, ou seja, diferentes de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, em que provavelmente pertencem à variantes de espectro estendido. No entanto, necessita-se de confirmação dessa presunção por métodos de sequenciamento.

O estudo conduzido por Rivera-Jacinto et al. (2015) aponta a espécie de *K.pneumoniae* como a mais frequente Enterobactéria recuperada de superfícies hospitalares devido a sua grande capacidade de sobrevivência em superfícies. Em seu trabalho 15 amostras foram recuperadas de superfícies de pias, mesas, camas e outras superfícies de uma enfermaria pediátrica, 7 foram identificadas como *K. pneumoniae* e todas elas carregavam o gene codificador de CTX-M.

De acordo com Rocha, Pinto e Barbosa (2016) as variantes da enzima mais identificadas no Brasil são CTX-M-2 e CTX-M-15, associadas principalmente a *K. pneumoniae* e *E. coli*. Ainda, segundo os autores até momento não há estudos conduzidos nas regiões norte e centro-oeste, o que ressalta a carência de dados de epidemiologias locais pelo fato de os trabalhos da região não estarem direcionados à esta temática. Em contrapartida, já existem trabalhos relatando a presença de CTX-M no Amazonas, mas sem a determinação de qual variante é mais prevalente no estado (FERREIRA et al., 2011). Tal escassez de dados reforça a necessidade de estudos sobre a epidemiologia local das enzimas para conhecimento do que nos acerca, com a possibilidade auxiliar nas recomendações de controle e sanitização.

De todas as 14 amostras produtoras de ESβL, duas amplificaram genes codificadores de CTX-M-8: ICAM-86 (*E. coli*) e HUGV-58 (*E.asburiae*). De forma curiosa, no Brasil tem sido descrita a presença de genes codificadores de CTX-M-8 e CTX-M-2 em carcaças de frangos importadas por países europeus, revelando a presença de *E. coli* amplamente distribuída em carnes de frangos, incluindo frangos tratados como orgânicos com padrão de multi-resistência. Além disso, estes genes encontrados em *E.coli* podem ser transferidos por

conjugação, com o risco de abrigar plasmídeos de outras bactérias (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014; BOTELHO et al., 2015).

O dado mais relevante em nosso estudo foi sobre a detecção da presença da enzima KPC em uma torneira de banheiro de uma enfermaria pediátrica do ICAM (ICAM-12) produzida por uma cepa de *K. pneumoniae*. Estes achados assemelham-se ao estudo direcionado por Tofteland e colaboradores (2013) em que detectaram a produção da enzima por espécies de *K. pneumoniae* e *E. asburiae* também de drenos de pias.

O estudo realizado por este autor constatou também a presença dos mesmos clones de KPC em pacientes internados nas enfermarias em que foram investigadas as cepas produtoras da enzima, onde um paciente adquiriu infecção após a intervenção das pias colonizadas com cloro, sugerindo que estes micro-organismos podem sobreviver bem no ambiente. Ainda, foi sugerido que a contaminação das mãos de profissionais da saúde durante a lavagem em pias contaminadas possibilita a transmissão cruzada a pacientes com sistema imunológico comprometido, instalados em terapias intensivas.

Outro trabalho a respeito de torneiras colonizadas por Enterobactérias produtoras de KPC foi desenvolvido por Leitner e colaboradores (2015), em que foi avaliada a produção da enzima por espécie de *K. oxytoca* e os clones da mesma espécie também foram encontrados em pacientes em uma divisão de hematologia de um hospital, onde se encontram pacientes com diferentes graus de suscetibilidade a doenças devido ao estado de imunossupressão.

Os primers CITM-F e CITM-R foram utilizados para amplificação das famílias LAT e CMY-2, em que houve anelamento em um isolado de *C. freundii* (ICAM-146), enquanto que os primers EBCM-F e EBCM-R que foram utilizados para amplificação das famílias MIR e ACT, anelaram em sequências de dois isolados de *E. asburiae* (ICAM-148 e ICAM-149). No entanto, pelo fato de um único par de primer possuir anelamentos específicos para mais de uma família, estudos adicionais seriam essenciais para diferenciar qual(is) enzima(s) o micro-

organismo de fato produz, por meio de técnica de PCR convencional com primers específicos de cada família, separadamente.

Sobre esses resultados, é importante ressaltar a presença de genes que codificam a enzima AmpC tanto em cromossomo como em plasmídeos bacterianos e que já foram descritos como enzimas intrínsecas de espécies de *Citrobacter* e *Enterobacter*. Segundo Campana (2009) de todas as cefalosporinases, a enzima CMY-2 é a mais frequentemente identificada de amostras clínicas no Brasil em que junto com a família LAT é codificada por genes cromossomais de *C. freundii*, de onde foram primeiramente isoladas. A família de enzimas MIR e ACT são intrinsecamente codificadas por genes do cromossomo de espécies de *Enterobacter*.

Em base desta temática e observando que provavelmente houve amplificação para os quatro genes codificadores das famílias das enzimas descritas (bla_{LAT} , bla_{CMY-2} , bla_{MIR} e bla_{ACT}), experimentos adicionais precisariam ser realizados pra confirmar se esses anelamentos foram inespecíficos em relação às AmpC cromossomais de *Citrobacter* e *Enterobacter* ou se de fato se trata de uma pAmpC e que foi transferida para esses micro-organismos que já carregam as AmpC cromossomais. No entanto, possivelmente esses três anelamentos para essas três amostras foram referentes às AmpC cromossomais por serem intrínsecas desses micro-organismos.

5.5 Caracterização Molecular

A técnica de RAPD PCR foi aplicada aos isolados de mesma espécie identificados como produtores de ES β L e carbapenemases. Ao todo, 7 amostras de *K. pneumoniae* e 5 amostras de *Enterobacter* sp. foram submetidas a análise de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard's (figura 12). Amostras com coeficiente de similaridade acima de 80% foram consideradas relacionadas e pertencentes ao mesmo clone "cluster" (figuras 13 e 14).

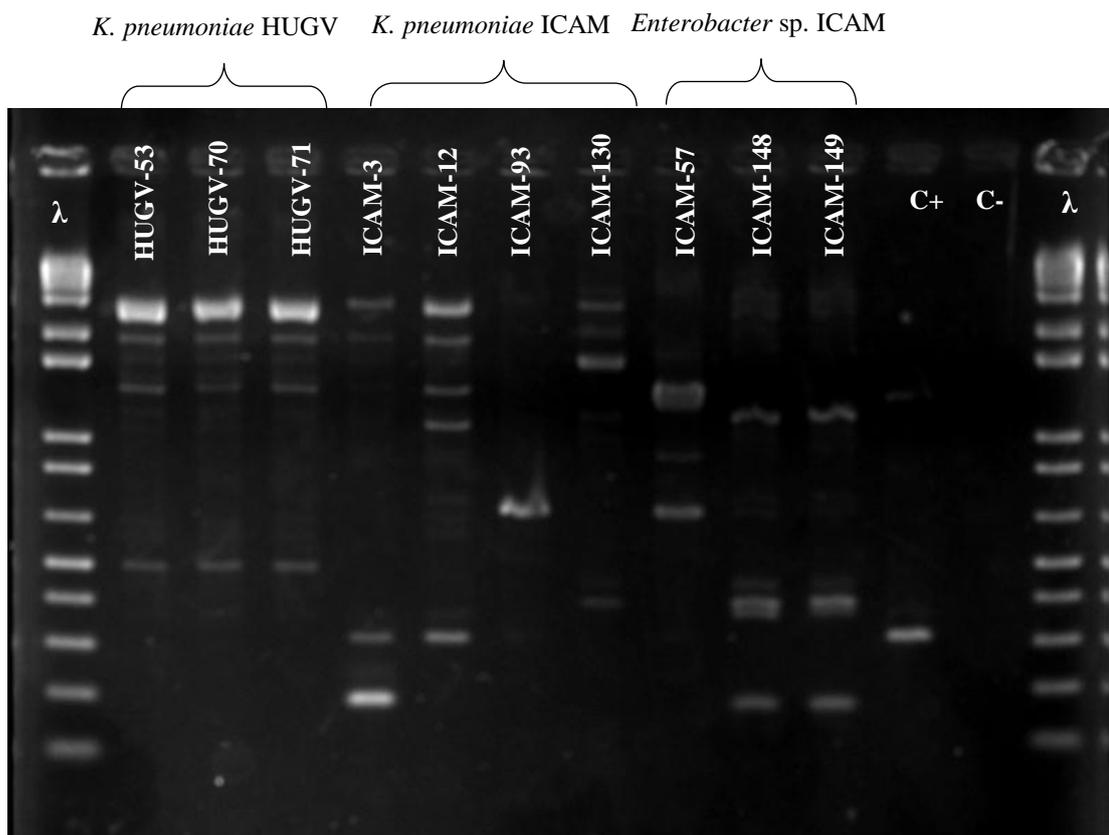


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da reação de PCR empregando a técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso para os isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* sp. obtidos com o primer 1247. A primeira e última raias do gel correspondem ao marcador de peso molecular 1 kb. Condições de corrida: 120V, 90 mA, até alcançar 7,5cm de corrida.

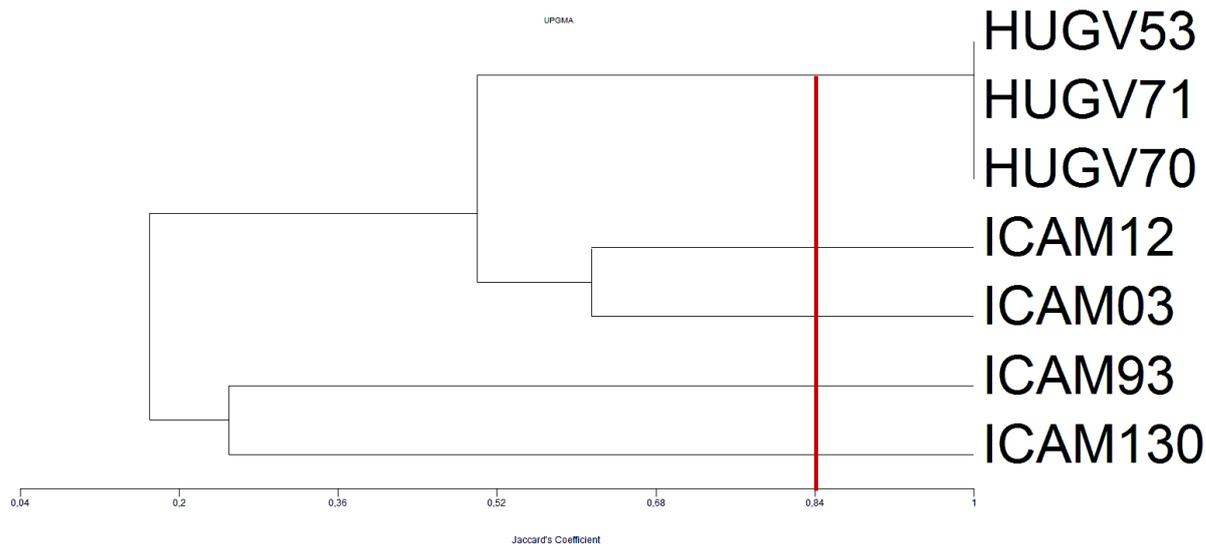


Figura 13: Dendrograma da similaridade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* obtidos pela análise simultânea dos primers 1247 e 1283.

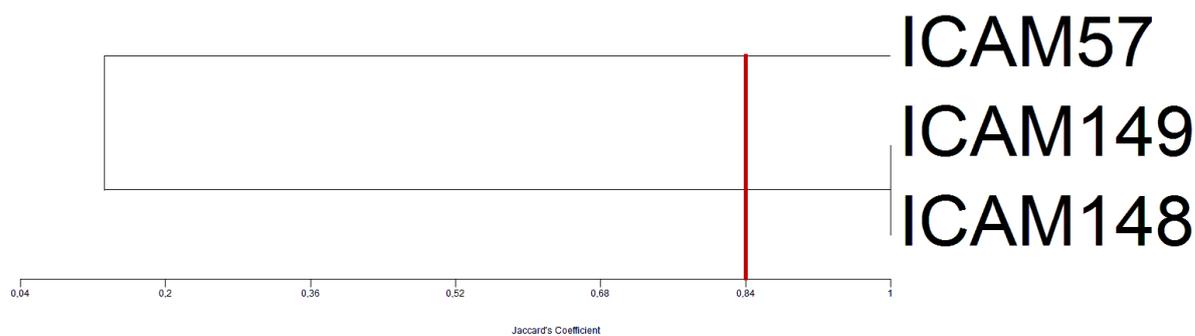


Figura 14: Dendrograma da similaridade genética entre os isolados de *Enterobacter* obtidos pela análise simultânea dos primers 1247 e 1283.

A partir da análise dos dendrogramas para avaliação da similaridade dos isolados de *K. pneumoniae* (figura 13), foram obtidos 5 padrões diferentes sendo que um dos padrões tem amostras relacionadas, com 100% de similaridade. As amostras HUGV-53, HUGV-70 e HUGV-71 foram recuperadas do mesmo hospital, porém de fômites diferentes. A amostra HUGV-53 é oriunda da estrutura lateral do leito 88 da clínica ortopédica. A amostra HUGV-

70 foi obtida a partir da estrutura lateral do leito 91 da clínica cirúrgica. A amostra HUGV-71 foi recuperada da torneira da enfermaria 3, também da clínica cirúrgica.

Este padrão de similaridade reflete a propagação do micro-organismo no ambiente hospitalar. Curiosamente, as clínicas cirúrgica e ortopédica são instaladas em andares diferentes no HUGV, sugerindo que a colonização dos fômites descritos foi mediada por mãos de profissionais de saúde ou dispositivos compartilhados entre pacientes. Ainda, HUGV-70 e HUGV-71 foram isoladas da mesma enfermaria, e pode-se inferir que houve transmissão cruzada da torneira colonizada para a estrutura lateral do leito do paciente, representando um risco de possível colonização/infecção do mesmo.

A análise do dendrograma para avaliação da similaridade dos isolados de *Enterobacter* sp. (figura 14) permitiu observar que foram encontrados 2 padrões diferentes, em que um deles apresentou amostras 100% relacionadas. As amostras ICAM-148 e ICAM-149 foram recuperadas, respectivamente, da estrutura lateral e do colchão do leito 90 de uma enfermaria do ICAM. Esta análise confirma a suposição de que estas amostras se tratavam de um mesmo tipo de isolado bacteriano devido às semelhanças observadas no perfil de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco-difusão, com resistência aos mesmos antimicrobianos, e no perfil de produção de enzimas relacionadas, em que amplificaram genes codificadores de TEM, CTX-M-1/2 e MIR/ACT. Estes resultados confirmam a importância das superfícies como fontes de propagação de micro-organismos e intensificam a imposição de medidas de detecção e de sanitização do ambiente hospitalar.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- O grupo de BGN-NF foi o mais prevalente, e foram recuperados em maior proporção das torneiras em ambos os hospitais;
- Com relação às Enterobactérias, o maior número de isolados foi obtido do ICAM, com prevalência em estruturas laterais de leitos dos hospitais, onde as espécies do complexo de *Enterobacter cloacae* foram isoladas com maior frequência, seguidas de *K. pneumoniae*.
- O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos obtido pela técnica de disco-difusão demonstrou que a maioria dos isolados de ambos os hospitais foram resistentes à ampicilina e cefalosporina de 1ª geração, assinalando que esses isolados possuem pelo menos genes codificadores de β -lactamases de espectro restrito.
- A maior parte das Enterobactérias resistentes foram isoladas do ICAM, com prevalência em superfícies de colchão. Destas, um isolado de *K. pneumoniae* foi identificado fenotipicamente como produtor de carbapenemase.
- A enzima CTX-M-1/2 esteve presente em todas as amostras do ICAM, enquanto que no HUGV houve detecção em maior parte de enzimas do tipo TEM e SHV.
- Com as técnica de PCR convencional confirmou-se que o isolado de *K. pneumoniae* (ICAM-12) é produtor de carbapenemase, possuindo genes de codificação para enzima KPC.
- Os isolados HUGV-53, HUGV-71 e HUGV-70, que são espécies de *K. pneumoniae* apresentaram 100% de similaridade, assim como os isolados ICAM-148 e ICAM-148, ambos espécies de *E. asburiae*. Estes últimos foram recuperados de estrutura lateral e colchão de um mesmo leito de uma enfermaria do ICAM.

- O estudo corrobora com vários dados publicados na literatura acerca dos riscos potenciais que superfícies inanimadas hospitalares colonizadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases e carbapenemases funcionam como fômites de propagação de microorganismos no ambiente hospitalar, sendo necessárias as implementações de medidas de detecção para estudo da epidemiologia do hospital e medidas de sanitização para erradicar tais fômites de propagação.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades Mês	Março 2014	Abril 2014	Mai 2014	Junho 2014	Julho 2014	Agosto 2014	Setembro 2014	Outubro 2014	Novembro 2014	Dezembro 2014	Janeiro 2015	Fevereiro 2015	Março 2015	Abril 2015	Mai 2015	Junho 2015	Agosto 2015	Setembro 2015	Outubro 2015	Novembro 2015	Dezembro 2015	Janeiro 2016	Fevereiro 2016	Março 2016	Abril 2016	Mai 2016	Junho 2016	Julho 2016	Agosto 2016		
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Obtenção de créditos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																
Coleta de material e isolamento							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
Relatório e apresentação										X	X	X	X	X	X	X															
Identificação												X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Antibiograma														X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Testes fenotípicos																	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Caracterização molecular																							X	X	X	X	X				
Análise estatística																									X	X	X	X			
Redação final																														X	X
Apresentação final																															X

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBLER, R. P. The structure of *b*-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, p. 321-331, 1980.
- ANDRADE, A.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, J. V. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de terapia intensiva de hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 63-67, 2006.
- ANTUNES, N. T.; LAMOUREAUX, T. L.; TOTH, M.; STEWART, N. K.; FRASE, H.; VAKULENKO, S. B. Class D B-lactamases: Are they all carbapenemases? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2119–2125, 2014.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. Microbiologia básica.1 Edição. Volume único. **Editora Atheneu**. São Paulo, 2005.
- BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates**, v. 17, n. 1-2, p. 24–36, 2014.
- BOYCE, J. M. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. **J Hosp Infect**, v. 65, n. 2, p. 50-54, 2007.
- BOTELHO, L. A. B.; KRAYCHETE, G. B.; E SILVA, J. L. C.; REGIS, D. V. V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; BONELLI, R. R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249–254, 2015.
- BRADFORD, P. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for *b*-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.
- BUSH, K.; MACIELAG, M. J. New β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. **Informa Healthcare Rev.**, v. 20, n. 10, p. 1277-1293, 2010.
- CAMPANA, E. H.; BARBOSA, P. P.; FEHLBERG, L. C. C.; GALES, A. C. Frequency of plasmid-mediated AmpC in enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 477–480, 2013.
- CAMPANA, E. H. FREQUÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE β -LACTAMASES AMPC PLASMIDIAIS ISOLADAS EM INFECÇÃO DE CORRENTE SANGÜÍNEA. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São

Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia, 2009.

CARNEIRO, M.; GONÇALVES, R. A.; DE SOUZA, J. G.; TEIXEIRA, C. B.; KRUMMENAUER, E. C.; MACHADO, J. A. A.; WAIB, L. F.; PINA TRENCH, F. J. New carbapenases in Brazil. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 2, p. 155–156, 2014.

Centers for Disease Control and Prevention. *Klebsiella pneumoniae* in Healthcar Settings. Disponível em: <[www.cdc.gov.HAI/organisms](http://www.cdc.gov/HAI/organisms)>. Acesso em 15 de agosto de 2016.

CHOLLEY, P.; THOUVEREZ, M.; GBAGUIDI-HAORE, H.; SAUGET, M.; SLEKOVEC, C.; BERTRAND, X.; TALON, D.; HOCQUET, D. Hospital cross-transmission of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 8, p. 331–336, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. **CLSI document M100-S25**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CORRÊA, T. C.; DUARTE, H. A.; LOURENÇO, E. A.; RIBEIRO, G. J.; SILVA, L. F.; MEDEIROS, J. R.; SOUZA, N. C.; PEREIRA, C. A. Avaliação da população microbiana presente no interior do corpo das torneiras de uma UTI em um hospital no município de Volta Redonda. **Cadernos UniFOA - Edição Especial Ciências da Saúde e Biológicas**, p.17-21, 2013.

CREAMER, E.; HUMPHREYS, H. The contribution of beds to healthcare-associated infection: the importance of adequate decontamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 69, n. 1, p. 8–23, 2008.

CUNHA, C. B.; KASSAKIAN, S. Z.; CHAN, R.; TENOVER, F. C.; ZIAKAS, P.; CHAPIN, K. C.; MERMEL, L. A. Screening of nursing home residents for colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae admitted to acute care hospitals: Incidence and risk factors. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 2, p. 126–130, 2016.

DAIKOS, G. L.; PETRIKKOS, P.; PSICHOGIOU, M.; KOSMIDIS, C.; VRYONIS, E.; SKOUTELIS, A.; GEORGOUSI, K.; TZOUVELEKIS, L. S.; TASSIOS, P. T.; BAMIA, C.; PETRIKKOS, G. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-b-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 5, p. 1868-1873, 2009.

DANCER, S. J.; WHITE, L.; ROBERTSON, C. Monitoring environmental cleanliness on two surgical wards. **Int J environ Health Res**, v. 18, p. 357-364, 2008.

- DELGADO-VALVERDE, M.; SOJO-DORADO, J.; PASCUAL, A.; RODRIGUEZ-BANO, J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 1, n. 2, p. 49–69, 2013.
- DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203–209, 2009.
- DREES, M.; SNYDMAN, D. R.; SCHMID, C. H.; BAREFOOT, L.; HANSJOSTEN, K.; VUE, P. M. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 5, p. 678–685, 2008.
- DZIRI, R.; KLIBI, N.; ANDREA, C.; et al. Characterization of extended-spectrum β - lactamase (ESBL) -producing Klebsiella , Enterobacter , and Citrobacter obtained in environmental samples of a Tunisian hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 7–10, 2016.
- FERREIRA, C. M.; FERREIRA, W. A.; ALMEIDA, N. C. O. da S.; NAVECA, F. G.; DAS GRAÇAS, V. B. B. M. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1076–1084, 2011.
- FREEMAN, J. T.; NIMMO, J.; GREGORY, E.; TIONG, A.; DE ALMEIDA, M.; MCAULIFFE, G. N.; ROBERTS, S. A. Predictors of hospital surface contamination with Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: patient and organism factors. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 3, p. 1–7, 2014.
- GALVIN, S.; DOLAN, A.; CAHILL, O.; DANIELS, S.; HUMPHREYS, H. Microbial monitoring of the hospital environment: why and how? **Journal of Hospital Infection**, v. 82, n. 3, p. 143–151, 2012.
- GHAFOURIAN, S.; SADEGHIFARD, N.; SOHEILI, S.; SEKAWI, Z. Extended Spectrum β -lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Curr Issues Mol Biol**, v. 17, p. 11-22, 2014.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 Edição. Volume único. **Editora McGraw-Hill**. Rio de Janeiro, 2010.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HAMMAMI, A.; ARLET, G.; BEN REDJEB, S.; et al. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in tunisia caused by multiply drug resistant Salmonella wien producing SHV-2 beta-lactamase. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 641–646, 1991.

- HARRIS, P. N. A.; TAMBYAH, P. A.; PATERSON, D. L. β -lactam and β -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 475-485, 2015.
- HEDIN, G.; RYNBÄCK, J.; LORÉ B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. **J Hospital Infect**, v. 75, p. 314-317, 2010.
- HOSSAIN, A.; FERRARO, M. J.; PINO, R. M.; DEW, R. B.; MOLAND, E. S.; LOCKHART, T. J.; THOMSON, K. S.; GOERING, R. V.; HANSON, N. D. **Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2** in. v. 48, n. 11, p. 4438–4440, 2004.
- JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. Mechanisms of Disease - The New β -Lactamases. **N Engl J Med**, v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.
- JACOBY, G. A. AmpC B-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.
- JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOUNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis.**, v. 4, p. 867-868, 1988.
- JITENDRANATH, A.; RADHIKA, R.; BHARGAVI, L.; BHAI, G.; BAI, R. Current Trend of Nonfermenting Gram Negative Bacilli in a Tertiary Care Hospital in Trivandrum, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n.1, p. 425-429, 2016.
- KONEMAN, E. M.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKERBERGER, P. C.; WINN, W. C. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6 Edição. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2012.
- KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, S.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A. V.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J. B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M. A.; TURTON, J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 10, p. 597-602, 2010.
- LARANJEIRA, V.D.S.; MARCHETTI, D. P.; STEYER, J. R.; CORCAO, G.; PICOLI, S. U. Investigation of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* sp and *Pseudomonas aeruginosa* at an emergency hospital in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 462–464, 2010.

- LEITNER, E.; ZARFEL, G.; LUXNER, J.; HERZOG, K.; PEKARD-AMENITSCH, S.; HOENIGL, M.; VALENTIN, T.; FEIERL, G.; GRISOLD, A. J.; HÖGENAUER, C.; SILL, H.; KRAUSE, R.; ZOLLNER-SCHWETZD, I. Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* on a hematology ward. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 714–716, 2015.
- LEMMEN, S. W.; HÄFNER, H.; ZOLLDANN, D.; STANZEL, S.; LÜTTICHEN, R. Distribution of multi-resistant gram-negative versus gram positive bacteria in the hospital inanimate environment. **J Hosp Infect**, v. 56, n. 3, p. 191-197, 2004.
- LERNER, A.; ADLER, A.; ABU-HANNA, J.; MEITUS, I.; NAVON-VENEZIA, S.; CARMELI, Y. Environmental Contamination by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 177–181, 2013.
- LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V. C.; GALES, A. C.; MAMIZUKA, E. M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol**, v. 43, p. 516–519, 2005.
- LIVERMORE, D. M. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram- Negative Pathogens. **Korean J Intern Med**, v. 27, p. 28-142, 2012.
- LIVERMORE, D. M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 1941-1944, 2011.
- LIVERMORE, D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.
- LIVSHIZ-RIVEN, I.; BORER, A.; NATIV, R.; ESKIRA, S.; LARSON, E. Relationship between shared patient care items and healthcare-associated infections: A systematic review international. **Journal of Nursing Studies**, v. 52, p.380–392, 2015.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. S4, p. 4–9, 2014.
- MENDES, R. E.; KIYOTA, K. A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S. S.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C. C.; TUFIK, S. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544–547, 2007.
- MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. Manual of clinical microbiology. 9 Edição. Ed. Washington, DC. **ASM Press**, 2007.
- NASEER, U.; SUNDSFJORD, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microbial drug resistance**, v. 17, n. 1, p. 83-97, 2011.

- NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. **Perspective – N Engl J Med**, v. 371, n. 19, p.1761-1763, 2014.
- NETO, G. T. C.; MORAES, F. C.; NETO, V. M.; FIGUEREIDO, P. M. S. Detecção de Enterobactérias em Superfícies de uma Unidade Mista de Saúde no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma**, n. 2, p. 77-84, 2010.
- NIELSEN, K. L.; GODFREY, P. A.; STEGGER, M.; ANDERSEN, P. A.; FELDGARDEN, M. Selection of Unique *Escherichia coli* Clones by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by Whole Genome Sequencing. **J Microbiol Methods**, v. 103, p. 101-103, 2014.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 593-656, 2003.
- NOGUEIRA, K. S.; CONTE, D.; MAIA, F. V.; DALLA-COSTA, L. M. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 162–169, 2015.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, 2012a.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 3016–3022, 2012b.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.
- OLIVEIRA, A. C.; DAMASCENO, Q. S. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Rev Esc Enferm USP**, v. 44, n.4, p. 1118-1123, 2010.
- OLIVEIRA, A. D.; VIANA, R. E. H.; DAMASCENO, Q. S. Contamination of hospital mattresses by microorganisms of epidemiological relevance: an integrative review. **J Nurs UFPE**, v. 1, n. 7, p.236-245, 2013.
- OTTER, J. A.; YEZLI, S.; FRENCH, G. L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 32, p. 687-699, 2011.
- PAGÈS, J. M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 6, p. 893-903, 2008.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum *B* -Lactamases : a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. **New Engl J Med**, v. 362, p.1804-13, 2010.
- PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, 2002.
- PEREIRA, P. S.; DE ARAÚJO, F. M.; SEKI, L. M.; ZAHNER, V.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 312-316, 2013.
- PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-Determined AmpC-Type-Beta-Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2002.
- POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiol**, v. 2, n. 5, p. 501-512, 2007.
- POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLUN, V.; NORDMANN, P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebs. pneu. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.
- POTTER, P. A.; PERRY, A. G.; ELKIN, M. K. Procedimentos e intervenções de enfermagem. 5 Edição. Rio de Janeiro. **Elsevier**, 2013.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 20, p. 440–458, 2007.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENIDERSO, G. Rang & Dale: Farmacologia. 7 Edição. **Editora Elsevier**. Rio de Janeiro, 2011.
- RASMUSSEN B. A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; O’GARA, C.; MEDEIROS, A. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 40, p. 2080–2086, 1996.
- RIVERA-JACINTO, M.; RODRÍGUEZ-ULLOA, C.; FLORES CLAVO, R.; SERQUÉN LÓPEZ, L.; ARCE GIL, Z. TEM and CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* isolates from inanimate surfaces of hospital environments. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, v. 32, n. 4, p. 752–5, 2015.
- ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.
- ROUX, D.; AUBIER, B.; COCHARD, H.; QUENTIN, R.; MEE-MARQUET, N. Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the patient environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 85, p. 106-111, 2013.

- β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, 2015. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em 10 de agosto de 2016.
- STARLANDER, G.; MELHUS, A. Minor outbreak of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit due to a contaminated sink. **J Hosp Infect**, v. 82, p. 122-124, 2012.
- SUARÉZ, C.; GUDIOL, F. *B*-lactam antibiotics. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.
- TOFTELAND, S.; NASEER, U.; LISLEVAND, J. H.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, ORJAN. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.
- TURNER, P. J. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 51, p. 281-89, 2005.
- WANG, J. L.; CHEN, M. L.; LIN, Y. E.; CHANG, S. C.; CHEN, Y. C. Association between contaminated faucets and colonization or infection by nonfermenting gram-negative bacteria in intensive care units in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3226–3230, 2009.
- WEBER, D. J.; RUTALA, W. A.; MILLER, M. B.; HUSLAGE, K.; SICKBERT-BENNETT, E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 5 SUPPL., p. S25–S33, 2010.
- WEBER, D. J.; ANDERSON, D.; RUTALA, W. A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 26, n. 4, p. 338–44, 2013.
- WOLF, I.; BERGERVOET, P. W. M.; SEBENS, F. W.; VAN DEN OEVER, H. L. A.; SAVELKOUL, P. H. M.; VAN DER ZWET, W. C. The sink as a correctable source of extended-spectrum β -lactamase contamination for patients in the intensive care unit **Journal of Hospital Infection**, v. 87, p. 126-130, 2014.
- YANG, Y.; WU, P.; LIVERMORE, D. M. Biochemical characterization of a ??-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 755–758, 1990.
- ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. **Crit Rev Microbiol**, v. 37, p. 214-26, 2011.

9. ANEXOS

Anexo 1. Resultados da determinação dos halos de inibição aos antimicrobianos testados das 23 amostras de Enterobactérias do HUGV e 33 amostras do ICAM

Amostra	Espécie	Antimicrobianos											
		AMP	CFL	CRO	CAZ	FEP	MEM	IMI	ATM	AMI	GEN	TOB	CIP
HUGV - 6	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	26	17	30	29	27	28	20	17	17	27
HUGV - 7	<i>Salmonella sp.</i>	0	0	29	20	33	35	32	35	22	18	19	36
HUGV - 8	<i>Salmonella sp.</i>	0	0	27	18	33	31	30	31	22	20	19	36
HUGV - 26	<i>E. cloacae</i>	0	0	24	15	33	29	26	30	25	21	22	31
HUGV - 27	<i>E. cloacae</i>	0	0	24	18	32	29	26	29	24	18	19	27
HUGV - 28	<i>P. anatis</i>	0	0	22	17	37	33	34	33	27	29	26	39
HUGV - 30	<i>E. cloacae</i>	0	0	23	15	30	29	26	30	20	19	18	28
HUGV - 44	<i>C. koseri</i>	0	0	27	18	31	30	30	31	18	15	27	33
HUGV - 51	<i>E. coli</i>	0	0	26	17	30	30	30	30	21	18	17	0
HUGV - 53	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	33	33	32	11	28	26	24	31
HUGV - 54	<i>E. cloacae</i>	0	0	29	17	32	30	27	30	20	18	19	33
HUGV - 58	<i>E. asburiae</i>	0	0	11	18	20	31	27	30	15	10	0	22
HUGV - 60	<i>E. cloacae</i>	0	0	25	18	32	32	27	32	22	20	19	32
HUGV - 62	<i>E. kobei</i>	0	0	22	17	31	30	24	30	22	17	17	26
HUGV - 63	<i>E. cloacae</i>	0	0	28	18	32	32	27	0	21	18	19	30
HUGV - 64	<i>K. oxytoca</i>	0	0	0	0	25	36	32	13	25	23	21	29
HUGV - 70	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	18	30	28	12	21	20	10	0
HUGV - 71	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	17	29	29	12	20	15	9	0
HUGV - 78	<i>P. agglomerans</i>	0	0	23	15	28	32	30	30	24	23	23	33
HUGV - 87	<i>E. asburiae</i>	0	0	27	17	34	32	27	32	22	21	20	33
HUGV - 89	<i>P. agglomerans</i>	0	0	19	17	29	32	30	32	22	22	19	30
HUGV - 91	<i>E. cloacae</i>	0	0	22	17	33	32	34	33	23	21	20	32
HUGV - 98	<i>E. coli</i>	30	0	24	20	32	32	27	30	22	20	18	30

Anexo 1. Continuação

Amostra	Espécie	Antimicrobianos											
		AMP	CFL	CRO	CAZ	FEP	MEM	IMI	ATM	AMI	GEN	TOB	CIP
ICAM - 1	<i>K. pneumoniae</i>	0	10	30	20	34	31	29	33	21	19	20	29
ICAM - 3	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	18	32	34	0	22	13	10	0
ICAM - 12	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	12	17	16	0	24	21	21	0
ICAM - 14	<i>E. asburiae</i>	0	0	28	19	31	30	29	29	18	16	18	27
ICAM - 17	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	29	21	31	30	29	34	22	21	21	29
ICAM - 18	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	25	18	29	29	28	29	9	19	20	26
ICAM - 20	<i>S. marcescens</i>	30	0	30	21	38	35	31	35	22	19	19	33
ICAM - 22	<i>E. cloacae</i>	0	0	22	27	29	29	20	27	18	0	17	25
ICAM - 23	<i>E. cloacae</i>	0	0	18	17	30	27	26	27	17	16	16	27
ICAM - 31	<i>E. asburiae</i>	0	0	26	27	33	30	24	34	19	17	18	28
ICAM - 34	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	29	18	34	39	38	39	27	21	22	30
ICAM - 39	<i>S. marcescens</i>	0	0	22	17	30	29	29	27	20	18	15	29
ICAM - 40	<i>P. dispersa</i>	0	0	25	0	31	30	28	26	21	21	19	27
ICAM - 57	<i>E. cloacae</i>	0	0	0	0	17	29	26	14	19	17	9	17
ICAM - 62	<i>P. dispersa</i>	16	0	22	12	27	31	28	29	20	19	18	26
ICAM - 73	<i>S. marcescens</i>	0	0	26	18	32	31	31	31	24	20	13	30
ICAM - 86	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	12	30	29	0	13	0	0	0
ICAM - 93	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	20	31	30	0	21	0	0	0
ICAM - 99	<i>E. cloacae</i>	26	0	27	18	34	35	35	33	28	24	24	31
ICAM - 112	<i>C. freundii</i>	24	0	28	19	33	30	30	33	21	20	19	26
ICAM - 117	<i>E. cloacae</i>	0	0	22	17	28	29	25	27	19	17	17	28
ICAM - 126	<i>E. cloacae</i>	0	0	24	16	32	30	26	28	20	19	16	29
ICAM - 130	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	18	10	31	32	28	28	23	21	20	33
ICAM - 132	<i>S. marcescens</i>	0	0	26	16	30	27	28	28	27	18	14	27
ICAM - 133	<i>S. marcescens</i>	0	0	27	14	34	34	30	32	22	19	14	30
ICAM - 135	<i>E. asburiae</i>	0	0	24	19	32	30	28	30	21	18	17	32
ICAM - 138	<i>L. adecarboxylata</i>	27	0	27	19	31	31	31	34	22	20	19	29
ICAM - 139	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	28	19	32	30	31	36	21	20	19	30
ICAM - 146	<i>C. freundii</i>	0	0	0	0	17	36	30	16	21	0	10	14
ICAM - 148	<i>E. asburiae</i>	0	0	0	0	14	33	28	11	23	0	10	16
ICAM - 149	<i>E. asburiae</i>	0	0	0	0	17	34	29	13	24	0	10	19
ICAM - 156	<i>P. dispersa</i>	0	0	20	11	31	32	21	31	23	21	19	30
ICAM - 160	<i>L. adecarboxylata</i>	30	0	23	20	32	30	28	35	22	19	19	29

Anexo 2. Termo de anuência – HUGV



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do Projeto de Pesquisa intitulado **“Ocorrência e Perfil de suscetibilidade de Pseudomonas Aeruginas Isoladas de Superfícies Inanimadas no HUGV”** que tem por Pesquisador Guilherme Domingo Bindá e como Orientadora Karin Regina Carlim da Costa

Manaus, 03 de julho de 2013.

Prof. Dr. Fernando Luiz Westphal
Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão do HUGV

Anexo 3. Termo de anuência – ICAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do Projeto de Pesquisa intitulado **“Ocorrência e Perfil de suscetibilidade de Pseudomonas Aeruginas Isoladas de Superfícies Inanimadas no HUGV”** que tem por Pesquisador Guilherme Domingo Bindá e como Orientadora Karin Regina Carlim da Costa

Manaus, 03 de julho de 2013.

Prof. Dr. Fernando Luiz Westphal
Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão do HUGV