

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TARCÍSIO CROCOMO

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO HOSPITALAR E
COMUNITÁRIA, ISOLADAS NO HOSPITAL REGIONAL HANS
DIETER SCHMIDT DE JOINVILLE – S.C. – BRASIL**

**Florianópolis
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TARCÍSIO CROCOMO

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO HOSPITALAR E
COMUNITÁRIA, ISOLADAS NO HOSPITAL REGIONAL HANS
DIETER SCHMIDT DE JOINVILLE – S.C. – BRASIL**

**Dissertação apresentada para a obtenção
do título de mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

**Florianópolis
2005**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Mário Steindel, pela dedicação, amizade, confiança, paciência e pela constante disposição de ensinar, pesquisar e estudar. Um grande exemplo. Um grande amigo.

À minha esposa, Maria Zulma, pela paciência, incentivo e apoio em todos os momentos do curso, sempre proporcionando as melhores condições para que pudesse seguir em frente nos estudos, principalmente cuidando dos nossos filhos. Amamo-nos muito.

Aos meus filhos, Ana Júlia e Tarcísio Eduardo, sempre me estimulando e apoiando, apesar dos meus momentos de ausência. O papai ama vocês.

A todos meus familiares, sobretudo, dona Ada, minha mãe e meu saudoso pai, Francisco, que, onde estiver, sempre está me ajudando, meu sogro, Zulmar e minha sogra, Juracy, pelo apoio.

À colega de mestrado, Bibiana Paula Dambros, que, sem a sua ajuda na realização dos experimentos, teria ficado muito mais difícil, obrigado pelos ensinamentos e pela sua enorme colaboração e paciência. Aprendi muito com você.

Ao meu irmão, Professor Doutor Fernando Crocomo, maior incentivador para que eu realizasse o mestrado. E a sua esposa, Iraci, também.

Aos professores Edmundo e Carlos, sempre nos apoiando no decorrer do curso, com seus ensinamentos e amizade.

À professora Célia, que me deu a chance de fazer a primeira disciplina como aluno especial, muito obrigado. Foi assim que começou.

Aos meus sobrinhos, Elisa e Rolf, foram muitos dias de hospedagem na casa de vocês, boas conversas e bons cafés. `A minha sobrinha, Amanda, também na batalha do mestrado na arquitetura, muito obrigado.

Aos colegas Danielle, Cláudia, Rodrigo, Cris, Ane e Leonardo, sempre bem humorados e dispostos para ajudar.

Ao proprietário do Laboratório KG, bioquímico, Omar Ghanen, e aos bioquímicos Ângela e Paulo, pelo auxílio na obtenção das amostras.

Aos funcionários da Comissão de Infecção Hospitalar do Hospital Regional, pela enorme colaboração no trabalho, Irmã Sandra, Janaína, Adriane, Valdéia e Juliana.

Aos colegas do Posto de Saúde Glória em Joinville, sempre me ajudando, nas trocas dos horários dos atendimentos, para poder cumprir os créditos em Florianópolis.

À Direção do Hospital Regional de Joinville, nos apoiando para a realização do curso.

À Fundação Universitária de Joinville, UNIVILLE, pelo apoio financeiro, no período do curso.

Ao Laboratório de Antibióticos da UFSC e ao Laboratório Médico Santa Luzia, por ceder gentilmente amostras padrão.

Ao Professor Doutor Edson Campos, diretor da Faculdade de Medicina da Univille, pelo estímulo em realizar o curso.

Às secretárias do mestrado, Joyce e Lígia, sempre me lembrando de tudo que não poderia esquecer, especialmente as datas das matrículas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 - INTRODUÇÃO	11
1.1. - Histórico	11
1.2. - Os principais tipos de infecções hospitalares	14
1.3. - Doenças infecciosas bacterianas	17
1.4. - Características das bactérias estudadas	18
1.5. - Medidas adotadas para prevenção de infecções hospitalares	21
1.6. - Estrutura genética bacteriana	25
1.7. - Ribossomo 16S	27
1.8. - Reação em cadeia da polimerase	28
1.9. - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP	29
2 - OBJETIVOS	31
2.1. - Objetivo Geral	31
2.2. - Objetivos Específicos	31
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. - Extração de DNA genômico e plasmidial	33
3.2. - Amplificação do DNAr 16S	34
3.3. - Perfil de restrição do produto amplificado	35
4 - RESULTADOS	37
4.1. - Amplificação do segmento DNAr 16S das amostras bacterianas	42
4.2. - Perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S DNAr com diferentes enzimas de restrição	42
5 - DISCUSSÃO	48
6 - CONCLUSÕES	58
7 - PERSPECTIVAS	59
8 - REFERÊNCIAS	60
9 - ANEXOS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas das amostras isoladas e identificadas através de provas microbiológicas e bioquímicas convencionais.	39
Tabela 2: Espécies bacterianas identificadas de acordo com o tipo de infecção diagnosticado.	40
Tabela 3: Identificação de amostras bacterianas resistentes.	41
Tabela 4: Atividades das enzimas de restrição testadas para digestão do fragmento amplificado do gene 16 S de DNAr de diferentes espécies de bactérias.	43
Tabela 5: Enzimas de restrição que digeriram o fragmento amplificado do gene 16 S de DNAr de diferentes espécies de bactérias e seus respectivos ribotipos.	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etideo representativo da amplificação do fragmento do gene 16S DNAr de diferentes amostras de espécies de bactérias isoladas de pacientes. Grupos bacterianos: a – *Escherichia coli*, b – *Staphylococcus aureus*, c – *Klebsiella* sp, d – *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* sp e PM = padrão de peso molecular PUC 18 digerido com *HaeIII*. 42
- Figura 2:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Pseudomonas aeruginosa* digerido com *HaeIII*. 44
- Figura 3:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Escherichia coli* digerido com *HaeIII*. 45
- Figura 4:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Enterobacter* sp. digerido com *HaeIII*. 45
- Figura 5:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Proteus mirabilis* digerido com *HaeIII*. 46
- Figura 6:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Klebsiella* sp. digerido com *HaeIII*. 47
- Figura 7:** Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Staphylococcus aureus* digerido com *Avall*. 47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg – micrograma

μL – microlitro

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

bp – pares de base

Bpn – broncopneumonia

CCIH – Comissão de controle de infecção hospitalar

CDC - EUA – Centers for Disease Control and Prevention - Centro de
Controle de Doenças dos Estados Unidos da América

DM – diabetes mellitus

DNA – ácido desoxiribonucleico

DNAr – DNA ribossomal

dNTPs – dideoxi-nucleotídeo trifosfato

DO – densidade óptica

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

HCl – ácido clorídrico

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HRHDS – Hospital Regional Hans Dieter Schmidt

ITU – infecção do trato urinário

IRC – insuficiência renal crônica

K – potássio

LB – Lurian Bertani

LMW - low-molecular weight – padrão de baixo peso molecular

M – molar

MgCl_2 – cloreto de magnésio

mM – micromolar

MS – Ministério da Saúde

NaCl – cloreto de sódio

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

ND – não determinado
NNIS – National Nosocomial Infection Surveillance System
ng – nanograma
nm – nanomolar
NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance
°C – grau centígrado
PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogenionico
PM – peso molecular
pmol – picomol
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de tamanho de fragmentos
RNA – ácido ribonucléico
SAME – Serviço de Estatística e Arquivo Médico
SES – Secretaria Estadual da Saúde
SDS – dodecil sulfato de sódio
Taq – *Thermus aquaticus*
TRIS – tris hidroximetil aminometano
TSI – tris hidroximetil aminometano
UI – unidade internacional
VM – ventilação mecânica

RESUMO

Métodos moleculares complementam as análises microbiológicas e bioquímicas tradicionais de forma mais precisa na identificação dos agentes bacterianos causadores de infecção em nível hospitalar. Neste estudo, avaliamos a variabilidade genética de bactérias isoladas no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt no município de Joinville, Santa Catarina. Sessenta amostras foram obtidas de diferentes isolados clínicos (sangue, urina, secreções de feridas cirúrgicas) de pacientes acometidos por infecções hospitalares ou comunitárias. As amostras bacterianas e submetidas à identificação por técnicas tradicionais de microbiologia e caracterizadas molecularmente pela técnica da PCR-RFLP. Amostras bacterianas cultivadas por 18 horas em meio LB foram diluídas a 1:100 ou DNA purificado foram submetidas à amplificação via PCR utilizando iniciadores para a região 16S do DNAr. A variabilidade genética das amostras foi determinada pela clivagem com diferentes endonucleases de restrição e a visualização dos produtos feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata. O tamanho do produto amplificado do gene 16S de DNAr foi idêntico para as diferentes amostras estudadas. Das 10 endonucleases testadas, 5 foram capazes de clivar o fragmento amplificado de 977 pb. Os perfis de restrição mostraram 2 grupos para *Pseudomonas aeruginosa*, 3 para *Staphylococcus aureus*, 3 para *Enterobacter* sp, 2 para *Klebsiella* sp, 2 para *Proteus mirabilis* e 3 para *Escherichia coli*. As enzimas de restrição *Avall* e *HaellI* geraram perfis mais complexos e permitiram distinguir as espécies por meio do polimorfismo encontrado. A amplificação do fragmento de 977 pb do gene do DNAr a partir de amostras de cultura mostrou-se um método simples e reprodutível e PCR-RFLP apresentou-se como uma técnica adequada para avaliar a variabilidade genética das espécies estudadas. Estes resultados poderão auxiliar no planejamento das atividades de controle das infecções hospitalares, assim como nos estudos de epidemiologia.

Palavras-chave: infecção hospitalar, 16S DNAr, PCR-RFLP, variabilidade genética, bactéria.

ABSTRACT

Molecular methods complement traditional microbiological and biochemical analysis in a more precise manner, in the identification of bacterial agents, which cause infections at the hospital level. In this study, we evaluated genetic variability of bacteria isolated at Hospital Regional Hans Dieter Schmidt, municipality of Joinville, Santa Catarina State. Sixty samples were isolated from different clinical samples (blood, urine, and surgical wound secretions) from patients with hospital or communitary infection. Specific identification of the bacterial samples was done by traditional microbiological techniques and molecular characterization was made by PCR-RFLP method. Bacterial isolates were cultivated in LB medium for 18 hours and the amplification of the DNAr fragment was performed using primers directed to the 16S DNAr region. DNA amplification using both purified DNA or diluted bacterial culture showed a 977 pb DNA fragment. Genetic variability of the bacterial samples was assessed by digestion with different restriction enzymes and the restriction profile was submitted to electrophoresis in 8% polyacrilamid gels silver stained. All bacterial samples studied presented a 977pb DNAr fragment. Five out of 10 restriction enzymes tested were able to cleave the 977 pb amplified fragment. Each bacteria species could be grouped in different groups according to the restriction: *Pseudomonas aeruginosa* 2 groups, *Staphylococcus aureus* 3 groups, *Enterobacter* sp. 3 groups, *Klebsiella* sp. 2 groups, *Proteus mirabillis*, 2 groups and *Escherichia coli* 3 groups. The enzymes *Avall* and *Haelll* presented the more complex profiles and allowed to distinguishing the species based on the polymorphism found. Amplification of the 977 pb of 16S DNAr gene directly from culture samples proved to be a simple and reproducible method and PCR-RFLP was an easy technique to evaluate the genetic variability of the bacterial species. These results can aid in planning activities for controlling hospital infections as well as for epidemiological studies.

Keywords: hospital infection, 16S DNAr, PCR-RFLP - genetic variability, bacteria.

1 – INTRODUÇÃO

A crescente preocupação relacionada às infecções hospitalares e a necessidade de identificação dos agentes bacterianos causadores de doenças mostram que a associação de métodos microbiológicos tradicionais e moleculares quer para a identificação desses microorganismos, quer na determinação do grau de susceptibilidade e/ou resistência dos mesmos às drogas antibacterianas disponíveis, são elementos de grande importância para os estudos epidemiológicos das doenças infecciosas em ambiente hospitalar.

1.1. – Histórico

O histórico das infecções hospitalares é tão antigo quanto a história dos hospitais, sendo que os seus primeiros relatos datam do ano de 325. Durante séculos, os pacientes foram tratados sem cuidados, como o compartilhamento de leitos entre dois pacientes, sem a preocupação de serem separados por patologias. Essas situações determinavam altos índices de disseminação de doenças infecciosas intra-hospitalares como cólera e febre tifóide. No início do século XIX, na Inglaterra, algumas medidas tais como o isolamento de pacientes por patologia já puderam comprovar a diminuição das doenças infecciosas nosocomiais (FERNANDES, 2000).

Na Áustria, o médico de origem húngara, Ignaz Philipp Semmelweis, em 1841, com a introdução da prática de lavagem das mãos, e Oliver Holmes, na Inglaterra, em 1843, salientaram que cuidados para evitar doenças veiculadas pelas mãos reduziram a mortalidade por processos infecciosos nos hospitais. Dessa

forma, demonstraram, de maneira definitiva, a hipótese de transmissão de doenças em ambiente hospitalar.

No século XX, os estudos consolidaram-se definitivamente. No Brasil, as primeiras medidas oficiais de controle da infecção hospitalar datam de 1993 e, atualmente, a matéria é regida pela portaria do Ministério da Saúde nº 2626, de 12 de maio de 1998 (Anexo 1), (COUTO & PEDROSA, 1999).

No Brasil, são poucos os estudos publicados sobre as infecções hospitalares, sendo difícil a obtenção de dados definitivos nesta área. Porém, hoje esse panorama tem melhorado (ALMEIDA & PEDROSO, 1999; LACERDA, 2002; TURRINI & SANTO, 2002).

Sendo as infecções hospitalares um grave problema de saúde pública no país, a inobservância de princípios básicos do controle das infecções hospitalares pode ter conseqüências drásticas (BRASIL, 2001). A grande maioria das infecções hospitalares é causada por um desequilíbrio da relação existente entre a microbiota humana normal e os mecanismos de defesa do hospedeiro (FERNANDES, 2000).

A infecção hospitalar pode ocorrer devido a vários fatores, como a própria patologia de base do paciente, procedimentos invasivos e alteração da população microbiana, geralmente induzida pelo uso de antibióticos (ELLENBERG, 2004). Por serem doenças transmissíveis, as infecções hospitalares apresentam uma cadeia epidemiológica que pode ser definida a partir de seus seis elos, a saber: agente infectante, reservatórios ou fontes, vias de eliminação, transmissão, penetração e hospedeiro susceptível (CASTRO & RIBEIRO, 1999).

Sabidamente, qualquer infecção pode ser contraída no ambiente hospitalar, mas os germes que predominam nas infecções nosocomiais raramente causam

infecções em outras situações (FERNANDES, 2000). Esses microorganismos exibem baixa virulência, mas em decorrência do seu inóculo e da queda de resistência imunológica do hospedeiro, o processo infeccioso se desenvolve. Geralmente estes agentes fazem parte da microbiota humana normal. As bactérias predominam na notificação das infecções hospitalares, principalmente as aeróbicas. Por outro lado, os vírus e os fungos têm uma participação importante, porém são pouco isolados, sendo, dessa forma, subnotificados (FRIDKIN & JARVIS, 1996; BRASIL, 2001).

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC-EUA) define como infecção hospitalar aquela doença que não estiver presente no momento da internação e ainda aquelas que não estiverem em período de incubação na data da admissão no hospital. O diagnóstico da presença e localização da infecção hospitalar é dado pelo conjunto de dados clínicos e laboratoriais. No Brasil, a portaria ministerial que regulamenta as comissões de controle de infecção hospitalar incorpora esse conceito (BRASIL, 1998).

Por outro lado, as doenças infecciosas causadas por bactérias que não se enquadram no conceito acima são chamadas de infecções comunitárias, que, como nas infecções hospitalares, ocorrem todos os processos necessários para se desenvolver um quadro infeccioso, como a adesividade do patógeno, quantidade de inóculo, virulência do agente etiológico, resposta do hospedeiro e seu grau de imunocompetência e especialmente a crescente resistência das bactérias aos agentes antibióticos também nas infecções em nível comunitário. As doenças infecciosas bacterianas comunitárias também acometem os diversos órgãos e sistemas do corpo humano, manifestando-se como infecções urinárias,

respiratórias, intestinais, pele e tecidos (SADER, 2001; HEINZELMANN, M. et al, 2002)

1.2. – Os principais tipos de infecções hospitalares

A maioria das infecções hospitalares manifesta-se como complicações naturais de pacientes gravemente enfermos, decorrente de um desequilíbrio entre sua microbiota normal e seus mecanismos de defesa. Esse desequilíbrio é provocado por determinadas doenças responsáveis pela hospitalização e procedimentos invasivos ou terapêuticas imunossupressivas a que o doente, correta ou incorretamente, foi submetido. A unidade de tratamento intensivo, em função de sua alta complexidade, habitualmente apresenta elevadas taxas de infecção hospitalar. Em uma unidade pediátrica avaliada, a taxa de infecção hospitalar chegou a 27,3%, tendo como causas mais comuns as infecções urinárias, 56,5%, respiratórias, 34,8%, e por dispositivos intravasculares, 10,5% (DEEP, 2004).

As infecções hospitalares resultam de interações complexas entre o microrganismo e o hospedeiro e de múltiplos fatores causais que interagem diferentemente predispondo infecções de diversos tipos. Conseqüentemente, algumas infecções hospitalares são evitáveis, enquanto outras não (MOLLITT, 2002).

Dentre as principais infecções hospitalares endêmicas, a infecção do trato urinário (ITU) é a mais comum. A instrumentação do sistema urinário representa o fator de risco mais importante na aquisição de ITU, principalmente a sondagem vesical, associada a cerca de 90% dos casos, ao passo que outros procedimentos são responsáveis por 5 a 10%. Nos pacientes mantidos sob sondagem vesical, com a urina sendo drenada em reservatórios abertos, o risco de infecção pode atingir

100% após quatro dias. Naqueles que utilizam sistema de drenagem fechado, em torno de 50% dos pacientes desenvolvem ITU após 10 a 14 dias, sendo possível a prevenção de 70 a 85% destes episódios em relação ao sistema aberto (STAMM & COUTINHO, 1999).

Os fatores de risco associados ao hospedeiro que resultam em maior incidência de infecção relacionada ao cateter vesical são: idade avançada, sexo feminino, gravidez, puerpério, colonização do meato uretral, urina vesical residual, doenças subjacentes graves e uso indiscriminado de antimicrobianos. O agente predominante das infecções do trato urinário é a *Escherichia coli*, seguida de outras enterobactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida* sp., embora a prevalência destes agentes se modifique em diferentes instituições (STAMM & COUTINHO, 1999; OLIVEIRA et al, 2001; DIAS NETO et al, 2003).

A infecção da ferida cirúrgica é importante topografia de infecção hospitalar em muitas instituições. O principal fator predisponente é o potencial de contaminação da cirurgia, além do tempo de duração do procedimento e da condição pré-operatória do paciente (COUTO & PEDROSA, 1999). Estes três fatores determinam o índice de risco de infecção cirúrgica, de acordo com a metodologia NNIS - National Nosocomial Infections Surveillance. As infecções de sítio cirúrgico representam 24% do total de infecções hospitalares, sendo o segundo tipo mais freqüente (PITTET & WENZEL, 1994). Nos Estados Unidos da América, representam mais de 500.000 novos casos por ano (NICHOLS, 1991).

Outros fatores de risco influem na ocorrência de infecção no sítio cirúrgico: tempo de permanência prolongado no período pré-operatório, expondo o paciente às cepas hospitalares; a presença de infecção, concomitante, de drenos e próteses; o estado nutricional dos tecidos operados e, em especial, a técnica cirúrgica

utilizada. A técnica de preparo da pele do paciente é outro fator relevante, pois a tricotomia deve ser realizada no máximo até duas horas do início da cirurgia, diminuindo assim o risco de infecção (FERNANDES, 2000).

A infecção do trato respiratório é também uma das principais causas de infecção hospitalar. Fatores como idade, patologia de base, instrumentação do trato respiratório, colonização da orofaringe com flora intestinal favorecida pela neutralização do pH do estômago e pelo uso de sondas, endoscopia, equipamentos de terapia respiratória e broncoaspiração predispõem ao aparecimento dessas infecções. A pneumonia hospitalar está associada com a utilização de ventilação mecânica, principalmente nas unidades de terapia intensiva, e, de forma geral, apresenta alta taxa de mortalidade nas infecções hospitalares (SADER, MENDES & GALES, 2001).

As bacteremias primárias são muitas vezes causas importantes de infecções hospitalares. O avanço tecnológico introduziu o uso de terapias cada vez mais invasivas, contribuindo para maior sobrevivência do paciente, dentre elas, destaca-se o acesso vascular, favorecendo, deste modo o aumento da incidência de infecções da corrente sanguínea (COUTO & PEDROSA, 1999). Os fatores de risco associados a esse tipo de infecção são: idade, alterações dos mecanismos de defesa locais ou sistêmicos (perda da integridade da pele, imunodeficiência ou imunodepressão), utilização de insumos contaminados, emulsões lipídicas, severidade da doença de base, dentre outros. As bacteremias primárias são documentadas por cultura positiva de sangue, onde nenhum outro sítio de infecção foi achado como de origem, sendo somente estas consideradas hospitalares (FERNANDES, 2000).

No período de 1983 a 1985, a Organização Mundial de Saúde promoveu um estudo da prevalência da infecção hospitalar em 14 países usando um protocolo

padrão, o qual foi aplicado por médicos e enfermeiros locais, que ressaltou a preocupação com as infecções hospitalares. Neste estudo, a média de prevalência de infecções hospitalares foi de 8,7%, variando de 3% a 21% (MAYON – WHITE, 1988). Em 1994, uma pesquisa do Ministério da Saúde do Brasil constatou uma taxa de pacientes com infecção hospitalar de 13,1% (BRASIL, 2001).

1.3. – Doenças infecciosas bacterianas

As bactérias são microorganismos procariotos, disseminados em todos os ecossistemas e encontram-se associadas a organismos multicelulares. No caso dos seres humanos hígidos, onde habitam normalmente, participam de várias funções, como, por exemplo, na degradação de conteúdo intestinal, facilitando a digestão e absorção de nutrientes. As bactérias são, com frequência, causa de doenças infecciosas nos seres humanos, sendo essas doenças decorrentes da ação direta do microorganismo ou através da produção de toxinas nocivas aos seus hospedeiros agindo nos mais diferentes órgãos e sistemas (STROHL, ROUSE & FISHER, 2004).

O reino Monera compreende os organismos procariotos que inclui as arqueobactérias (bactérias primitivas), as cianobactérias (bactérias fotossintetizantes) e as eubactérias (bactérias verdadeiras), que compreendem todas as bactérias de importância médica (BARBOSA & TORRES, 1999). As bactérias são organismos unicelulares que se dividem por fissão binária, têm como características as seguintes estruturas: material genético, um cromosomo único e circular, ausência de membrana nuclear e de organelas, parede celular com peptidoglicanas, ribossomo 70S, membrana plasmática sem carboidratos e

normalmente sem esteróis e com tamanho médio entre 1 e 100 μm (TRABULSI & ALTHERTHUM, 2004).

A doença infecciosa, na maioria das vezes, é iniciada por colonização do hospedeiro, pelo patógeno que se estabelece e prolifera em mucosas e pele, sendo exceções as doenças causadas pela introdução de microorganismos diretamente na corrente sangüínea ou em órgãos internos. A colonização pode ter em sua seqüência a eliminação do microrganismo sem prejuízo ao hospedeiro ou a ocorrência da infecção quando esses microrganismos se multiplicam e induzem reação do hospedeiro por resposta imunológica ou de outro tipo. Na ocorrência de infecção, as conseqüências podem ser de danos teciduais e disfunções corporais (VERONESI & FOCACCIA, 2002; MIMS et al, 1999).

1.4. – Características das bactérias estudadas

Escherichia coli

O gênero *Escherichia* (Enterobacteriaceae) faz parte da microbiota normal do intestino em humanos e animais, podendo ser patogênica dentro e fora do trato digestivo. As diferenças de grau de patogenicidade entre as diversas cepas de *E. coli* são devido à presença de plasmídeos ou prófagos integrados ao genoma das mesmas. A bactéria possui fímbrias ou pili que são importantes para a sua aderência na superfície das mucosas dos hospedeiros. É um bacilo entérico gram negativo, anaeróbio facultativo, fermentador de lactose, cresce em meios de cultura como o ágar de MacConkey e as cepas podem ser caracterizadas por testes sorológicos. É uma bactéria causadora de doenças intestinais, do trato urinário, meningite neonatal e infecções hospitalares que incluem, além das citadas, a

septicemia, a bacteremia, o choque endotóxico e a pneumonia (STROHL, ROUSE & FISHER, 2004).

Enterobacter sp.

O gênero *Enterobacter* (Enterobacteriaceae) também pode fazer parte da microbiota normal do intestino grosso e raramente causando doenças, mas pode causar infecções oportunistas, estando associado, com frequência, às infecções hospitalares. São bacilos gram negativos móveis, fermentadores de lactose. Colonizam com muita frequência pacientes hospitalizados em tratamento prolongado com antibióticos, uso de cateteres ou procedimentos invasivos, além de infectar queimaduras, ferimentos, trato respiratório (pneumonia) e trato urinário (TRABULSI & ALTHERTHUM, 2004).

Klebsiella sp

O gênero *Klebsiella* (Enterobacteriaceae) pode fazer parte da microbiota normal do intestino grosso. São bacilos gram negativos grandes e imóveis com cápsula volumosa e podem causar pneumonia lobar necrotizante em indivíduos imunodeprimidos como diabéticos, alcoolistas e doentes com obstrução pulmonar crônica, além de, no ambiente hospitalar, causar infecções urinárias e bacteremias (STROHL, ROUSE & FISHER, 2004).

Proteus mirabilis

O gênero *Proteus* (Enterobacteriaceae) compreende bacilos gram negativos, causadores de doenças do trato urinário e outras infecções extra-intestinais. Essa bactéria também está relacionada às infecções nosocomiais, infectando ferimentos,

causando pneumonias e septicemia (BROOCKS, BUTEL & MORSE, 2000; TRABULSI & ALTHERTHUM, 2004).

Pseudomonas aeruginosa

É uma bactéria gram negativa e constitui-se em um patógeno humano primário, muito difundido na natureza (encontrado no solo, plantas, água e em animais). Pode colonizar seres humanos sem causar doenças, mas é um agente oportunista significativo principalmente como causa de infecção hospitalar. Pode ser causa de doenças sistêmicas e localizadas como infecções oculares, otite, pele, trato urinário, pulmonar, intestinal e do sistema nervoso central, além de doenças sistêmicas como septicemia, doença no sistema ósteo-articular e bacteremia (PELCZAR, CHAN & KRIEGER, 1997; MIMS et al, 1999).

Staphylococcus aureus

O gênero *Staphylococcus* (Micrococcaceae) vive em contato íntimo com o homem. Os estafilococos, juntamente com os estreptococos, constituem os principais agentes dos grupos dos cocos gram positivos de importância médica, causando desde doenças leves até fatais. *Staphylococcus aureus* é causa muito freqüente de infecção bacteriana na pele, aparelho respiratório, trato urinário e sistema ósteo-articular (STROHL, ROUSE & FISHER, 2004). Ademais, suas toxinas podem causar intoxicações alimentares e a síndrome do choque tóxico. A bactéria *Staphylococcus aureus* particularmente é causadora de infecção hospitalar, tendo como característica marcante sua alta ocorrência associada à resistência bacteriana crescente, especialmente os meticilina-resistentes (ALMER et al, 2002).

1.5. – Medidas adotadas para a prevenção de infecções hospitalares

As unidades hospitalares devem manter, em sua estrutura de funcionamento, um setor responsável pelo controle das infecções neste ambiente (EGGERTSON & SIBBALD, 2004). As atividades das equipes de controle das infecções em ambientes hospitalares devem considerar todos os setores assistenciais, porém as unidades de maior risco, como unidades de terapia intensiva e setores de cirurgia, requerem busca ativa diária para um melhor controle, uma vez que nesses ambientes a exposição dos pacientes é maior em virtude de estes estarem submetidos a procedimentos mais complexos e invasivos (MENDEZ et al, 2004). Essa estrutura deverá contar com recursos humanos habilitados e desenvolver projetos de atuação dessas unidades. No Brasil, a Portaria MS 2616 regulamenta esse propósito (BRASIL, 1998). Entre essas atividades estão incluídas ações como o controle do uso correto de antibióticos, sobretudo os de largo espectro. Alguns desses medicamentos devem ter seu uso autorizado pela unidade de controle de infecção hospitalar, tornando o uso desses agentes o mais coerente possível no sentido de diminuir sua pressão seletiva sobre a microbiota bacteriana e indução de resistência das bactérias aos antibióticos. No Canadá, um estudo que abordou o crescimento da resistência dos agentes infecciosos aos antibióticos mostrou que em 5 anos a incidência de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente, causadores de infecções hospitalares, aumentou de 1% para 8% nesse período (CONLY, 2002).

Outra atividade extremamente importante é a manutenção do estímulo e monitoramento das lavagens das mãos, medida de grande impacto na redução de transmissão de infecção hospitalar. Essas medidas devem ser permanentemente

executadas, com treinamentos periódicos, orientações por meio de cartazes, além de ações de vigilância (MARTINS, 2001).

As atividades dos centros de controle de infecção hospitalar incluem ainda o desenvolvimento e aprimoramento permanente mediante o estabelecimento de manuais e normas nas seguintes áreas: centro de esterilização de materiais, lavanderia hospitalar, setor de nutrição e dietética, normas de procedimentos técnicos médicos e de enfermagem no tocante ao risco de infecção, controle de acidentes pérfuro-cortantes e de imunização dos funcionários das unidades nosocomiais (HOTA, 2004).

O controle das infecções hospitalares é obrigatório, com acompanhamento diário dos dados epidemiológicos, a fim de detectar novos casos de infecção, a ocorrência de surtos e o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos. A elaboração de boletins com os dados obtidos e sua análise orientam medidas necessárias no andamento do trabalho dessas unidades. A ocorrência de surtos pode estar ligada a qualquer agente infeccioso nas unidades hospitalares. Porém, o *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) tem sido o agente mais comum identificado nas ocorrências de surtos de infecção hospitalar, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade e com grande poder de disseminação nos ambientes hospitalares (BERETTA et al, 2004).

Os resultados de culturas e antibiogramas gerados rotineiramente pelo laboratório representam uma fonte extremamente importante de dados para a vigilância epidemiológica. Esses dados servem de base para uma avaliação de tendências ou padrões de infecção, devendo ser armazenados para controle e comparações futuras (BAILLY et al, 2002). Além disso, o laboratório deve armazenar os principais microorganismos que normalmente incluem amostras com

resistência a antimicrobianos, espécies raramente isoladas em material clínico, amostras responsáveis por surtos e espécies mais difíceis de serem erradicadas ou que mais freqüentemente estão relacionadas com reinfecção, com a finalidade de disponibilizar material biológico para estudos clínicos e epidemiológicos (VERONESI & FOCACCIA, 2002).

Conforme Veronesi e Focaccia (2002), os principais objetivos dos bancos de microorganismos ou coleção de culturas são: a) contribuir com o tratamento clínico do paciente através da disponibilidade de microorganismos isolados em infecções anteriores, principalmente para aqueles pacientes que permaneceram infectados; b) contribuir para a investigação de surtos e epidemias através da disponibilidade de microorganismos isolados anteriormente à identificação do surto e que podem servir como cepas controle para o estudo; c) para fins de pesquisa, disponibilizando uma grande variedade de microorganismos para avaliação de técnicas novas. As espécies a serem armazenadas podem variar de hospital para hospital.

Vários métodos de tipagem têm sido utilizados na avaliação epidemiológica de patógenos hospitalares. Existem métodos tradicionais e os mais avançados, que empregam técnicas moleculares. Os métodos tradicionais como antibiograma, sorotipagem, biotipagem e fagotipagem são os mais utilizados (FERNANDES, 2000; PERSING, 1993).

As técnicas de biologia molecular permitem a obtenção, a partir de um único fragmento de DNA ou RNA, de milhões de cópias idênticas, garantindo o fornecimento de material necessário para importantes manipulações, como seqüenciamento, produção de sondas em larga escala, entre outras (HINRICHS & WISECARVER, 2003).

A introdução de técnicas de biologia molecular no diagnóstico médico tem possibilitado grandes progressos na identificação de doenças infecciosas. Segundo Konemam (1997), a detecção de um agente etiológico através de seu material genético apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais.

O controle microbiológico da microbiota hospitalar obriga uma íntima ligação do centro de controle de infecção hospitalar com o laboratório de análises clínicas de apoio das unidades de saúde. A aplicação correta das técnicas laboratoriais, desde a coleta, transporte e cultivo é extremamente importante para a orientação da terapêutica aplicada ao doente além de fornecer dados consistentes para o controle epidemiológico das infecções (WHELEN & PERSING, 1996). A associação de novas técnicas moleculares de diagnóstico dos agentes etiológicos de doenças infecciosas, com a utilização cada vez mais freqüente desses métodos, apresenta maior confiabilidade nos resultados, rapidez na obtenção dos mesmos, ainda trazendo maiores benefícios ao paciente e aos estudos epidemiológicos dessas doenças (FEY et al, 2003).

As infecções com bactérias resistentes a antibióticos em pacientes hospitalizados estão cada vez mais presentes, apesar dos esforços para o controle das infecções hospitalares, especialmente em unidade de tratamento intensivo e em hospitais de atendimento terciário. Estudos epidemiológicos em áreas regionalizadas de saúde demonstraram a ocorrência de transmissão de agentes infecciosos resistentes entre as unidades hospitalares de atendimento, ocorrendo através de pacientes colonizados e transferidos entre os serviços de assistência médica (SMITH et al, 2004).

Estudo de detecção de genótipos de microorganismos com importância clínica, para vigilância epidemiológica em casos de infecção hospitalar, no caso

enterococos resistentes à vancomicina, através de PCR, para a pesquisa dos genes *vanA* e *vanB*, apresentou, em comparação aos métodos tradicionais microbiológicos, melhor especificidade e sensibilidade, além de menor custo e maior rapidez na obtenção dos resultados (JAYARATNE & RUTHERFORD, 1999, HOUPIKIAN & RAOULT, 2002).

Em um estudo, SARWARI, et al (2004) demonstraram a importância da utilização de PCR para a identificação e a ribotipagem de cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras isoladas de pacientes em tratamento de unidades de terapia intensiva. Além de identificar as bactérias, relacionaram os isolados com os casos de infecções hospitalares e sua epidemiologia. Em outro estudo, de Ortiz-Herrera (2004), foi utilizado um método molecular para a caracterização de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, em grupo de pacientes com diagnóstico de fibrose cística, sendo que essa bactéria, freqüentemente, coloniza os pacientes portadores dessa doença. Ambos os estudos demonstraram a existência de variantes genéticas dessa bactéria.

1.6. – Estrutura genética bacteriana

O genoma dos procariotos é apresentado por cromossoma bacteriano em forma circular contendo cerca de 4000 bp de DNA. Alguns contêm genes adicionais em forma de plasmídeos que variam em seu tamanho de alguns pares de base até 100 bp. Os círculos de DNA cromossomal e plasmidial que contêm a informação genética para sua própria replicação são os replicons. Os genes associados a funções essenciais encontram-se nos cromossomos, enquanto os plasmídeos contêm genes associados a funções especializadas, como, por exemplo, a

degradação de cânfora, tolueno, octano e ácido salicílico em algumas espécies de *Pseudomonas* ou captação e metabolização da sacarose e captação de citrato em *Escherichia coli* (BARBOSA & TORRES, 1999). Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA que podem ser transferidos de uma bactéria para outra, assimilando genes de origens evolutivas diferentes e independentes nestes agentes microbianos. Uma das conseqüências desse processo genético é a observação de rápida propagação de resistência a antibióticos transmitidos por plasmídeos após o uso de tais fármacos (PELCZAR, CHAN & KRIEG, 1997).

Os transposons são segmentos de DNA móveis que podem se deslocar para diferentes posições no genoma de um organismo, podendo causar mutações, inserções e/ou deleções. Existem três classes distintas de transposons. A classe I compreende os retrotransposons, que primeiro transcrevem um fragmento de DNA em uma cópia de RNA e, depois, utilizando uma transcriptase reversa, produzem uma cópia de DNA a partir do RNA para ser inserido em uma nova localização. Os transposons classe II consistem em elementos de DNA que se movem de um lugar a outro dentro do genoma. Os transposons de classe III são também conhecidos como “miniature inverted-repeats” e ocorrem em grande quantidade em alguns tipos de genomas, sendo que sua função ainda não está totalmente esclarecida (TRABULSI & ALTHERTHUM, 2004). Os mais simples são seqüências de inserção que transportam a informação genética contendo genes com funções especializadas, como, por exemplo, a resistência a antibióticos (BARBOSA & TORRES, 1999; Kimball, 2005).

1.7. – Ribossomo 16S

Os ribossomos (sítios de síntese protéica) são estruturas complexas formadas por diversas moléculas de RNA e proteínas onde o RNAr combina-se com proteínas.

A estrutura de um ribossomo de *Escherichia coli* tem um coeficiente de sedimentação 70S e é composto de duas subunidades. A menor 30S consiste de uma molécula de rRNA 16S e 21 polipeptídeos diferentes. A subunidade maior de 50S contém um rRNA 5S, um rRNA 23S e 31 polipeptídeos diferentes. Os ribossomos de cada célula bacteriana contêm cerca de vinte mil destas unidades, sendo responsáveis por 80% do conteúdo de RNA e 10% de sua proteína. Mediante a comparação de seqüências de RNA 16S de diversas bactérias, presume-se que suas estruturas se mantêm conservadas durante sua evolução. O rRNA 16S da bactéria tem 1542 nucleotídeos (VOET, VOET & PRATT 2002).

O ácido ribonucléico ribossomal, RNAr, é um conjunto de moléculas de RNA transcritas a partir de genes codificadores de RNA ribossomal nas células, os quais são elementos que apresentam seqüências conservadas, devido a sua função estrutural no ribossomo. Nos seres vivos, essas moléculas variam de tamanho, e nas bactérias, são transcritos os seguintes rRNA: 5S, 16S e 23S em ordem crescente de tamanho (MANFIO, 2003).

A importância na identificação da seqüência do segmento 16S do DNAr para a identificação de bactérias em microbiologia clínica e sua correlação nas doenças infecciosas foram demonstradas por CLARRIFGE, (2004).

1.8. – Reação em cadeia da polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – polymerase chain reaction) é uma técnica que consiste na amplificação de um grande número de cópias de DNA por meio da utilização de um par de iniciadores, em geral contendo de 10 a 25 nucleotídeos, e de uma polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), que sintetiza cópias do fragmento de DNA a partir de uma única molécula de DNA molde em um termociclador. Esta técnica revolucionou o diagnóstico de agentes infecciosos, os estudos de doenças genéticas, a tipagem e caracterização de agentes infecciosos, o mapeamento genômico, a medicina forense e o estudo de DNA de espécimes fósseis (STRANCHAN & READ, 2002). Desde os primeiros relatos desta tecnologia, em meados da década de 80, ela tem tido numerosas aplicações na pesquisa básica e clínica.

A reação da PCR em testes diagnósticos está baseada na utilização de iniciadores específicos construídos a partir de uma seqüência repetitiva do genoma (seqüência-alvo). Os produtos de amplificação podem ser facilmente visualizados através de técnicas de eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida corados pelo brometo de etídeo ou pela prata, além de sua detecção com o uso de sondas genéticas. Os produtos de amplificação (amplicons) podem ainda ser submetidos à restrição com diferentes endonucleases, clonagem ou ao seqüenciamento genômico (VOET, VOET & PRATT 2002).

O seqüenciamento da região 16S DNAr é um método de grande importância na identificação de *Bacillus anthracis*, permitindo a rápida identificação do agente, principalmente em bioterrorismo, após amplificação do material desse segmento

genômico em PCR e posterior determinação de suas seqüências (SACCHI et al, 2002).

A variabilidade genética em amostras de enterococos também pode ser mostrada, em estudo que utilizou a PCR, o qual possibilitou a tipagem molecular das amostras por meio de RAPD, além do seqüenciamento do segmento 16S DNAr (MONSTEIN et al, 1998).

A utilização da PCR foi usada para a identificação de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado, nesse caso para *Klebsiella* e *E. coli*, realizando a macrorestrição do DNA obtido e eletroforese em campo pulsado, com análise do perfil de restrição das amostras estudadas (FREITAS, MACHADO & SOARES, 2003).

1. 9. - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP

A técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de DNA consiste na obtenção de fragmentos de DNA de um determinado genoma ou produto amplificado, através do tratamento do DNA com enzimas de restrição. Como cada enzima de restrição possui um sítio de ação específico, o número de fragmentos obtidos para cada uma das enzimas utilizadas corresponde ao número de sítios de restrição. Desta forma, este processo permite avaliar a variabilidade genética dentro de um determinado gene ou fragmento de DNA, possibilitando que os organismos possam ser agrupados de acordo com os perfis de restrição obtidos.

A PCR, como base diagnóstica para doenças infecciosas, está revolucionando a prática clínica. Os seus benefícios são observados pela

significante eficácia no diagnóstico de doenças agudas, pelo menor tempo e acurácia na obtenção de diagnósticos. A PCR associada com RFLP, como uma técnica molecular desenvolvida para aplicações clínicas, apresenta boa especificidade na identificação de diferentes patógenos, na identificação de vírus, bactérias e agentes infecciosos de doenças oportunistas e emergentes (YANG & ROTHMAN, 2004). A utilização de métodos moleculares, como a amplificação de material genético e análise dos seus polimorfismos de fragmentos de restrição, além do seqüenciamento de amostras, evidenciou a variabilidade de *Staphylococcus* resistentes à metilicina (UENO & JORGE, 2004).

2. – OBJETIVOS

2.1. – Objetivo Geral

Identificar as bactérias causadoras de infecção hospitalar e comunitária isoladas no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt no município de Joinville, e caracterizar a variabilidade genética através de PCR-RFLP.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os resultados de culturas de isolados bacterianos identificados pelo laboratório de microbiologia por meio de métodos tradicionais de bacteriologia e sua sensibilidade aos antibióticos testados.
- Caracterizar a variabilidade genética das espécies de bactérias isoladas com maior frequência através de PCR-RFLP do gene do DNAr 16S.
- Determinar os genótipos mais frequentes das bactérias associadas com maior frequência à infecção hospitalar.
- Correlacionar os dados clínicos e laboratoriais convencionais com os resultados da tipagem molecular.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido com amostras de culturas positivas para bactérias, no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt de Joinville, Estado de Santa Catarina, no período de maio a outubro de 2004. O Hospital Regional de Joinville está dividido em unidades: pacientes externos, emergência, internação cirúrgica, clínica médica masculina e feminina, psiquiatria, isolamento, hospital dia, centro cirúrgico e unidade de terapia intensiva. A média de atendimento ambulatorial é de 3.781 pacientes/mês e de emergência é de 6.751 pacientes/mês nas especialidades: Clínica Médica e Cirúrgica, Ortopedia, Pediatria e Odontologia. Possui 172 leitos ativados, destinados à clínica cirúrgica geral e especializada e clínica médica, com uma média de internação de 577 pacientes/mês (S.E.S., 2005). O índice médio de infecção hospitalar em 2003 e 2004 foi de 6,17%, segundo informação de boletim da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar - CCIH.

A coleta dos dados clínicos dos pacientes foi executada de acordo com protocolo pré-estabelecido (Anexo 2), com busca nos prontuários médicos dos pacientes, no Serviço de Estatística e Arquivo Médico do Hospital (SAME). Os dados obtidos foram: idade do paciente, diagnóstico da infecção, tempo de internação, fatores de risco e condições de alta.

As culturas dos isolados bacterianos foram disponibilizadas pelo serviço de microbiologia do hospital, prestado pelo laboratório localizado nas dependências da unidade de saúde. As bactérias foram obtidas a partir de diversos materiais biológicos, como urina, sangue e secreções de feridas cirúrgicas e com diagnósticos de infecção em várias topografias, conforme mostra a Tabela 1.

A identificação dos microorganismos seguiu os métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico, sendo que foram usados para urina, sangue e secreções em geral os seguintes meios de cultura como: Cled, manitol, ágar sangue e MacConkey, e as seguintes provas bioquímicas de identificação: TSI (para verificar fermentação), lisina, indol, ornitina, citrato, catalase, coagulase, hemólise em ágar sangue, optoquina, bile esculina e oxidase. Os antibiogramas foram realizados pelo método de difusão em gel segundo os parâmetros do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

O material processado no laboratório foi semeado em meio BHI e transportado sob refrigeração até o laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde essas amostras foram inoculadas e crescidas em meio líquido LB e mantido por 18 horas a 37°C sob agitação. Após o crescimento das bactérias, as mesmas foram conservadas em 20% de glicerol a – 80°C.

Foram analisados, neste estudo, 60 isolados obtidos de pacientes internados com doença infecciosa bacteriana, no período de tratamento, com e sem diagnóstico de infecção hospitalar, segundo os critérios adotados pela comissão de controle de infecção hospitalar do estabelecimento.

3.1. – Extração de DNA genômico e plasmideal

Para o isolamento de DNA genômico das amostras, foi utilizado inicialmente o método fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). As suspensões bacterianas crescidas em meio líquido foram centrifugadas e ao sedimento adicionado 200 µL de tampão de extração, contendo 50mM de TRIS-HCl,

100 mM de NaCl e 0,5% de SDS pH 8,0 e 100µg/mL de proteinase K e incubado por 2 horas a 37°C. A seguir, o DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol a 100% e acetato de sódio 3M a –20°C, lavado 2 vezes em etanol 70% e suspenso em 50 µL de água ultra pura. (FERNANDES, 2003; GONCALVES, 2000). As amostras foram dosadas em espectrofotômetro 260/280 nm e visualizadas em gel de agarose a 0,8% corado pelo brometo de etídeo e mantido a –20° até o seu uso. Como controle foram utilizadas amostras de bactérias padrão: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 9222, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, gentilmente cedidas pelo Laboratório Médico Santa Luzia e pelo Dr. Artur Smânia Junior, do Laboratório de Antibióticos da UFSC.

3.2. – Amplificação do DNAr 16S

Para a amplificação do DNAr, amostras de 10 ng de DNA bacteriano foram adicionadas a volume final de 20 µl da reação contendo TRIS-HCl 10mM em pH 8,5, MgCl₂ 50mM, dNTPs 2mM, 10 pmol de cada iniciador 515F e 1492R e 1UI de Taq DNA polimerase Labtrade[®]. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradiente[®] (Eppendorf, Hamburg). Cada conjunto de reações foi acompanhado de um controle negativo que continha todos os reagentes necessários à amplificação, exceto o DNA molde, e de um controle positivo contendo DNA das amostras ATCC. As condições da reação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, ligação dos iniciadores a 45°C por 1,5 minutos, extensão a 72°C por 2

minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo.

Com o objetivo de simplificar a metodologia de amplificação do gene rDNA 16S, usamos amostras diretamente da cultura. Para tanto, amostras de bactérias foram crescidas por 12 horas em meio LB a 37°C sob agitação. Quinhentos µl de cultura foram então centrifugados, suspensos em 500 µl de água ultrapura e diluída 100 vezes em água em volume final de 200 µl e a densidade óptica (DO) do material foi determinada em espectrofotômetro a 600nm e a DO ajustada para 0,015. Dois µl da suspensão bacteriana foram utilizados para a amplificação do gene DNAr 16S em um volume final de 50 µl contendo TRIS-HCl 10mM em pH 8,5, MgCl₂ 50mM, dNTPs 2mM, 10 pmol de cada iniciador 515F e 1492R e 1UI de Taq DNA polimerase Labtrade®.

As amplificações e as condições de reação foram as mesmas descritas anteriormente. Para a visualização do produto amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo. Em virtude dos resultados de amplificação do rDNA 16S de amostras de DNA purificadas e de amostras diretamente de cultura serem exatamente iguais, optamos por utilizar amostras diretamente de cultura em todas as amplificações.

3.3. – Perfil de restrição do produto amplificado

Para a seleção das enzimas de restrição, 5 µl do produto amplificado de cada espécie de bactéria foram incubados com 1 UI de 10 diferentes enzimas de restrição *EcoV*, *SmaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *Avall*, *Scal*, *SstI*, *PstI* e *HaeIII* por 8 horas em

temperatura de 37°C, de acordo com especificações do fabricante. Os produtos de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata e fotodocumentados. As endonucleases utilizadas foram adquiridas da Mersham[®], Biolab[®], Qbiogene[®], Invitrogen[®] e Gibco BRL[®].

A partir destes resultados, foram selecionadas 4 enzimas de restrição (*HaeIII*, *PstI*, *BamHI* e *AvaI*) que foram capazes de clivar o fragmento amplificado, mostrando melhor eficiência na discriminação das variabilidades ocorridas. Cinco enzimas não produziram clivagem do fragmento.

Para a avaliação comparativa do perfil de restrição das diferentes amostras, 10 µl do material amplificado foram incubados a 37°C por 8 horas com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* e *SmaI*, conforme descrito anteriormente. Os produtos de clivagem das amostras foram resolvidos em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata e os resultados registrados em aparelho de gel documentação. O DNA de pUC18 digerido com *HaeIII* foi utilizado como marcador molecular. Os perfis de restrição de grupo de bactérias foram comparados entre si para agrupamentos das amostras.

4 – RESULTADOS

No presente estudo, foram estudadas 60 bactérias isoladas pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Regional Hans Dieter Schmidt de Joinville, no período de maio até outubro de 2004. As isoladas positivas foram identificadas através de métodos microbiológicos convencionais e o teste de sensibilidade aos antibióticos foram realizados em discos de difusão, segundo os parâmetros do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

Desse total das 60 bactérias isoladas, 32 delas foram consideradas como sendo casos de infecção bacteriana hospitalar e, nos outros 28 casos, foram consideradas infecção bacteriana de origem comunitária, seguindo os critérios adotados pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar daquela unidade de saúde. Conforme os dados obtidos por meio da análise dos prontuários desses casos, e que constam na Tabela 1, observou-se que 32 pacientes eram do sexo masculino e 28 pacientes, do sexo feminino. A média de idade foi de 51,09 anos nos pacientes com infecção hospitalar e de 51,1 anos naqueles com infecção comunitária. O tempo médio de internação desses pacientes foi de 28,4 dias para pacientes com infecção hospitalar e de 10,2 dias para aqueles que apresentaram infecção comunitária.

Entre esses casos de patologias infecciosas, confirmadas com a identificação dos agentes bacterianos, 15 foram de pacientes que evoluíram para óbito, sendo distribuídos de acordo com o tipo da origem da infecção, dois casos com diagnóstico de infecção comunitária e os outros 13 tendo algum tipo de associação à infecção hospitalar.

Dentre os fatores de risco presentes nos casos estudados, o diabetes mellitus foi o mais freqüentemente encontrado, estando presente em 16 dos casos investigados, e desse total, a metade dos casos estavam associados com o diagnóstico de infecção hospitalar. Foram identificados outros fatores de risco como: idade avançada, tabagismo, etilismo, imunodeficiência, doença pulmonar crônica, drogadição, insuficiência renal crônica e vasculopatia.

Nos diagnósticos das infecções identificadas, a do trato urinário foi a de maior ocorrência, estando presente em 27 pacientes, e os demais casos foram distribuídos da seguinte forma: 9 de broncopneumonia, 7 de infecção de sítio cirúrgico, 8 casos relacionados com infecção da corrente sangüínea e os demais com lesões infectadas de pele, sendo essas as topografias mais comuns de infecção hospitalar, apesar de terem sido identificadas também nas afecções de origem comunitária.

As amostras confirmatórias das infecções bacterianas se distribuíram entre infecções de origem comunitária e hospitalar. Além disso, obtivemos ambos os tipos de infecção, conforme seu local de procedência, para todas as espécies presentes, como mostra a Tabela 2.

Tabela 1: Características epidemiológicas das amostras isoladas de bactérias isoladas e identificadas através de provas microbiológicas e bioquímicas convencionais.

nº da amostra	Topografia	Infecção	Sexo	Idade	Evolução Clínica	Tempo de internação (dias)	Fatores de risco
<i>Escherichia coli</i>							
7	Itu	Hospitalar	F	72	Alta	5	ND
5	Cirúrgico	Hospitalar	M	51	Alta	35	DM e IRC
18	Itu	Hospitalar	M	43	Óbito	5	Etilismo/ Tabagismo
38	Itu	Comunitária	M	52	Alta	4	DM
41	Itu	Comunitária	M	3	Alta	4	ND
48	Sepsis	Hospitalar	F	20	Óbito	16	DM
51	Itu	Comunitária	F	62	Alta	25	IRC
60	Itu	Hospitalar	M	65	Alta	27	ND
61	Itu	Hospitalar	M	26	Alta	60	ND
63	Itu	Hospitalar	F	38	Alta	10	Neoplasia
69	Itu	Comunitária	F	78	Alta	12	DM
72	Cirúrgico	Hospitalar	M	45	Alta	30	IRC
<i>Proteus mirabilis</i>							
2	Itu	Comunitária	F	52	Alta	7	ND
9	Sepsis	Comunitária	F	63	Óbito	9	DM
24	Sepsis	Hospitalar	M	51	Óbito	31	DM
75	Itu	Comunitária	M	63	Alta	14	ND
86	Pele	Comunitária	F	44	Alta	6	DM
<i>Enterobacter sp.</i>							
6	Itu	Comunitária	F	72	Alta	7	DM
17	Itu	Hospitalar	M	77	Óbito	14	Etilismo
23	Itu	Comunitária	F	63	Alta	4	ND
28	Pele	Comunitária	F	75	Alta	8	DM
44	Itu	Comunitária	M	59	Alta	5	ND
62	Itu	Hospitalar	F	75	Óbito	42	ND
81	Itu	Comunitária	F	0	Alta	5	ND
82	Itu	Comunitária	M	67	Alta	10	HIV
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
4	Bpn	Hospitalar	F	56	Alta	15	DPOC
10	Itu	Hospitalar	M	44	Óbito	20	ND/VM
22	Bpn	Hospitalar	F	42	Alta	32	ND/VM
27	Pele	Comunitária	M	63	Alta	7	Tabagismo
33	Pele	Comunitária	F	47	Alta	8	Vasculopatia
52	Sepsis	Hospitalar	M	67	Óbito	54	ND
39	Itu	Hospitalar	M	48	Óbito	18	DM
40	Pele	Comunitária	M	68	Alta	4	DM
47	Sepsis	Hospitalar	F	52	Óbito	45	ND
57	Bpn	Comunitária	F	66	Alta	20	ND
64	Bpn	Hospitalar	M	77	Alta	28	ND
85	Pele	Comunitária	M	66	Alta	40	ND
87	Cirúrgico	Hospitalar	F	81	Alta	57	ND

continua

continuação

Tabela 1: Características epidemiológicas das amostras isoladas de bactérias isoladas e identificadas através de provas microbiológicas e bioquímicas convencionais.

<i>Klebsiella sp.</i>							
12	Itu	Comunitária	M	0	Alta	4	ND
16	Cirúrgico	Comunitária	M	32	Óbito	2	Drogas
25	Itu	Hospitalar	M	57	Alta	11	DM
37	Cirúrgico	Comunitária	F	8	Alta	10	ND
53	Itu	Comunitária	F	31	Alta	10	HIV
55	Cirúrgico	Hospitalar	F	46	Alta	26	Neoplasia
68	Sepsis	Hospitalar	M	61	Óbito	16	Neoplasia tabagismo
83	Itu	Comunitária	M	67	Alta	10	HIV
<i>Staphylococcus aureus</i>							
13	Bpn	Hospitalar	M	51	Óbito	31	ND
14	Bpn	Hospitalar	F	60	Óbito	26	DM/VM
15	Cateter	Hospitalar	M	58	Alta	54	IRC
21	Pele	Comunitária	M	52	Alta	17	ND
34	Bpn	Hospitalar	M	21	Alta	24	ND/VM
36	Cirúrgico	Hospitalar	M	40	Alta	6	DM e etilismo
49	Itu	Hospitalar	F	46	Óbito	10	ND
54	Bpn	Hospitalar	F	46	Alta	47	DM/VM
56	Bpn	Comunitária	F	66	Alta	20	ND
67	Pele	Hospitalar	M	50	Alta	78	ND
73	Sepsis	Hospitalar	F	1	Alta	18	ND
78	Itu	Hospitalar	M	68	Alta	20	ND
84	Pele	Comunitária	F	44	Alta	7	DM
88	Itu	Comunitária	M	67	Alta	10	HIV

ND – não determinado, VM – ventilação mecânica, HIV – vírus da imunodeficiência humana, DM – diabetes mellitus, IRC – insuficiência renal crônica e DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica, Itu – infecção do trato urinário e Bpn – broncopneumonia.

Tabela 2: Espécies bacterianas identificadas de acordo com o tipo de infecção diagnosticado.

Bactéria	Infecção comunitária	Infecção hospitalar	Total
<i>Escherichia coli</i>	4	8	12
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1	5
<i>Enterobacter sp.</i>	6	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	8	13
<i>Klebsiella sp.</i>	5	3	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	10	14
Total	28	32	60

A avaliação da sensibilidade aos antibióticos dos microorganismos isolados, das várias amostras estudadas, foi realizada por meio do teste de discos de difusão impregnados com agentes anti-infecciosos, aplicados em placas de ágar previamente semeadas com esses isolados de bactérias. O antibiograma, através da análise de discos de difusão, nos fornece dados qualitativos relacionados à sensibilidade, resistência ou sensibilidade intermediária das bactérias. De acordo com o padrão do National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS), na análise dos resultados obtidos referentes a resistência bacteriana aos antibióticos, encontraram-se entre os isolados dos *Staphylococcus aureus*, 2 amostras com padrão de resistência à metilcilina. Nos isolados das *Pseudomonas aeruginosa*, 7 apresentaram padrão de multiresistência para cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, carbapenêmicos e às quinolonas. E nos isolados das *Klebsiella* sp., foram identificadas 3 amostras com padrão de multiresistência, contra os aminoglicosídeos, aztreonam e às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, conforme evidencia a Tabela 3.

Tabela 3: Identificação de amostras bacterianas resistentes.

Bactéria	Amostras resistentes	Antibiograma – disco de difusão
<i>Staphylococcus aureus</i>	54 e 73	Oxacilina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22, 27, 39, 47, 52, 57, 87	Cefalosporina 3ª e 4ª gerações, carbapenêmicos e quinolonas
<i>Klebsiella</i> sp.	53, 55 e 83	Aminoglicosídeos, aztreonam e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações

4.1. – Amplificação do segmento DNAr 16S das amostras bacterianas

A amplificação do fragmento do gene 16S de DNAr, tanto do DNA genômico extraído, quanto do material obtido diretamente da cultura bacteriana, realizada por PCR, com iniciadores específicos 515F e 1492R, mostrou a presença do produto esperado (banda de 977 pares de base). Em todas as amostras, independentemente da espécie de bactérias, o produto do PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1,5%, evidenciando a banda de forma uniforme nas diferentes espécies de bactérias, segundo a Figura 1.

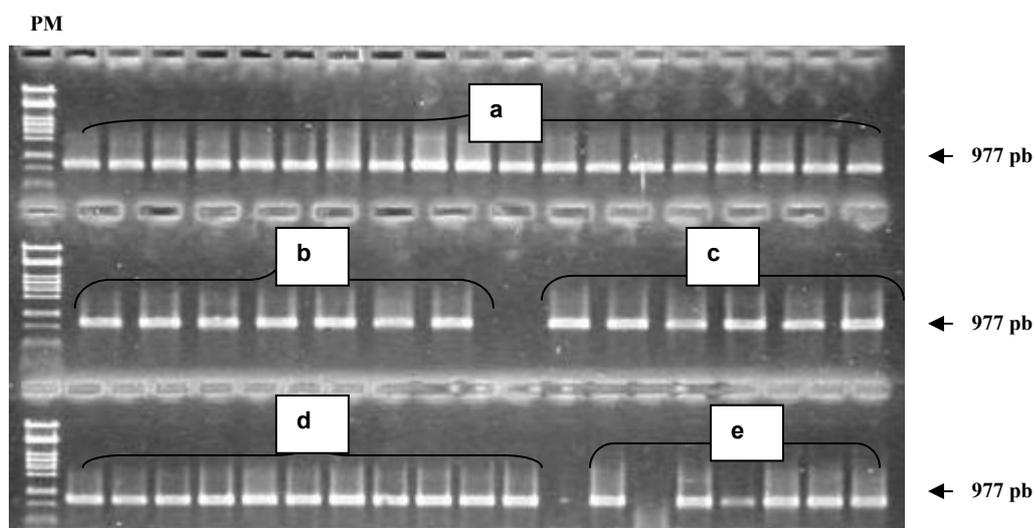


Figura 1: gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etideo representativo da amplificação do fragmento do gene de DNAr de diferentes amostras de espécies de bactérias isoladas de pacientes. Grupos bacterianos: a – *Escherichia coli*, b – *Staphylococcus aureus*, c – *Klebsiella* sp., d – *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* sp. e PM = padrão de peso molecular pUC 18 digerido com *HaeIII*.

4.2. – Perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S DNAr com diferentes enzimas de restrição

Para a análise do perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S do DNAr foram testadas 10 diferentes enzimas de restrição (Tabela 4). As enzimas

HaeIII, *Avall*, *BamHI*, *HindIII* e *PstI* foram capazes de clivar o fragmento amplificado, não ocorrendo o mesmo com as enzimas *SstI*, *Scal*, *EcoRV*, *EcoRI* e *SmaI* (Tabela 4).

Tabela 4: Atividades das enzimas de restrição testadas para a digestão do fragmento amplificado do gene 16 S de DNAr de diferentes espécies de bactérias.

Enzimas	Espécies					
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter r sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
<i>EcoRV</i>	-	-	-	-	-	-
<i>SmaI</i>	-	-	-	-	-	-
<i>BamHI</i>	-	-	+	-	-	-
<i>EcoRI</i>	-	-	-	-	-	-
<i>HindIII</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Avall</i>	-	+	-	+	+	+
<i>Scal</i>	-	-	-	-	-	-
<i>SstI</i>	-	-	-	-	-	-
<i>PstI</i>	-	+	-	-	-	-
<i>HaeIII</i>	+	-	+	+	+	+

Tabela 5: Enzimas de restrição que digeriram o fragmento amplificado do gene 16 S de DNAr de diferentes espécies de bactérias e seus respectivos ribotipos.

Bactéria	Enzimas	Ribotipos
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>HaeIII</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>PstI</i> , <i>Avall</i> , <i>HindIII</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>HaeIII</i> , <i>BamHI</i>	2
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>HaeIII</i> , <i>Avall</i>	3
<i>Klebsiella sp.</i>	<i>HaeIII</i> , <i>Avall</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	<i>HaeIII</i> , <i>Avall</i>	3

O número de grupos de diferentes ribotipos encontrados nos 6 gêneros bacterianos estudados variou de 2 a 3 gêneros, evidenciando, dessa maneira, a variabilidade genética dentro das espécies analisadas, como exhibe a Tabela 5.

Com base nestes resultados, o fragmento amplificado de *Pseudomonas aeruginosa* foi digerido com as enzimas *BamHI* e *HaeIII* e resolvido em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata. Os resultados mostraram um número variável de bandas e a análise dos perfis permitiu agrupar as 13 amostras em dois ribotipos: um grupo formado pelas amostras 4, 10, 22, 27, 33, 52, 39, 40, 57, 64, 85, 87 e a amostra padrão da ATCC e outro compreendendo a amostra 47 (Figura 2).

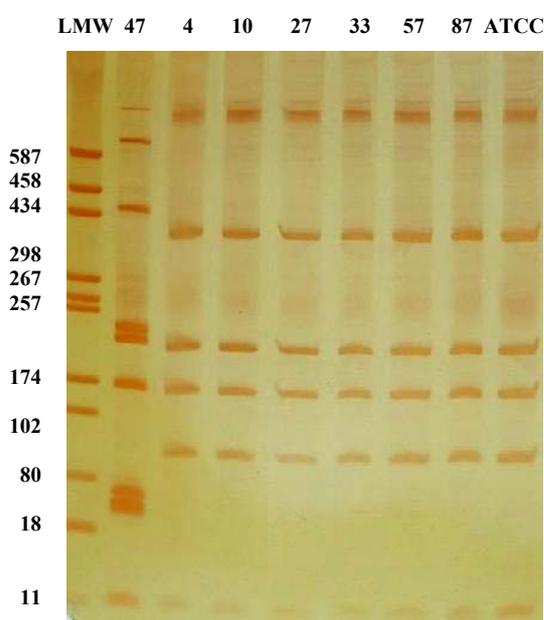


Figura 2: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Pseudomonas aeruginosa* digerido com *HaeIII*.

Os perfis de restrição de 12 amostras de *Escherichia coli* obtidos com as enzimas *Avall* e *HaeIII* mostram com ambas enzimas 3 ribotipos: um formado pelas amostras 41 e 60, um reunindo as amostras 18, 48, 63, 69 e 72 e outro compreendendo as amostras 5, 7, 38, 51, 61 e a amostra padrão ATCC (Figura 3).

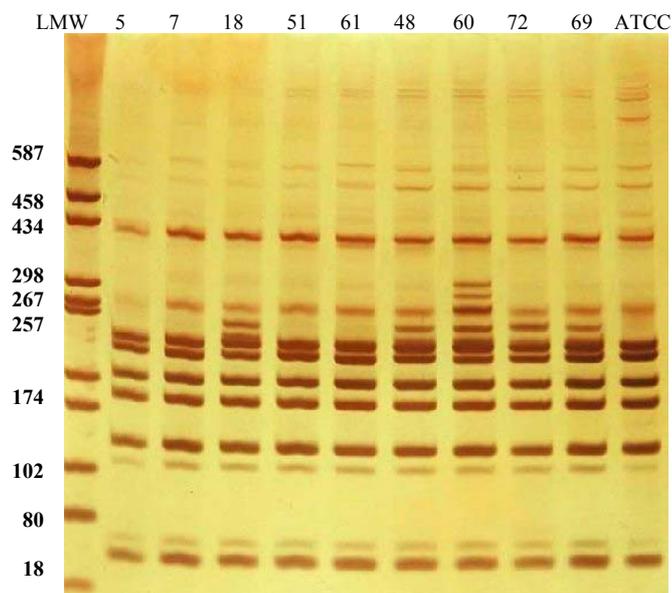


Figura 3: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Escherichia coli* digerido com *HaeIII*.

O fragmento amplificado de 8 amostras de *Enterobacter* sp. digerido com as enzimas *HaeIII* e *Avall* mostrou 3 ribotipos: um com as amostras 6, 17, 23, 28, 44, 82 e a amostra padrão ATCC, pela amostra 62 e outro pela amostra 81 (Figura 4).

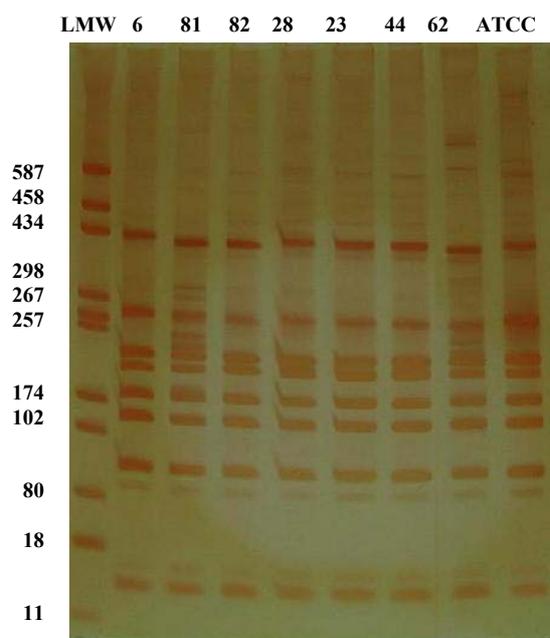


Figura 4: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Enterobacter* sp. digerido com *HaeIII*.

O fragmento amplificado de cinco amostras de *Proteus mirabilis* digerido com a enzima *HaeIII* mostrou 2 ribotipos: um com as amostras 75, 86, 2 e a amostra padrão ATCC e o outro com a amostra 24 (Figura 5). A amostra 9 foi equivocadamente identificada pela bacteriologia como *Proteus*, porém tratava-se de amostra de *Pseudomonas aeruginosa*.

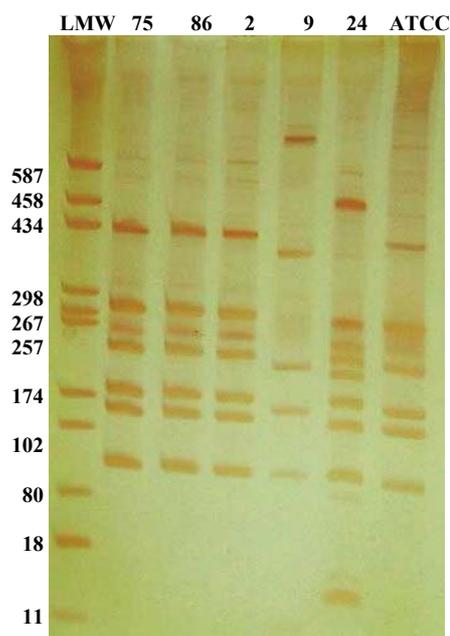


Figura 5: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Proteus mirabilis* digerido com *HaeIII*.

O fragmento amplificado do 16S de *Klebsiella* sp. digerido com as enzimas *HaeIII* e *Avall* mostrou 2 ribotipos: um compreendendo as amostras 12, 16, 37, 83, 55, 68 e a amostra ATCC e o outro, a amostra 25 (Figura 7)

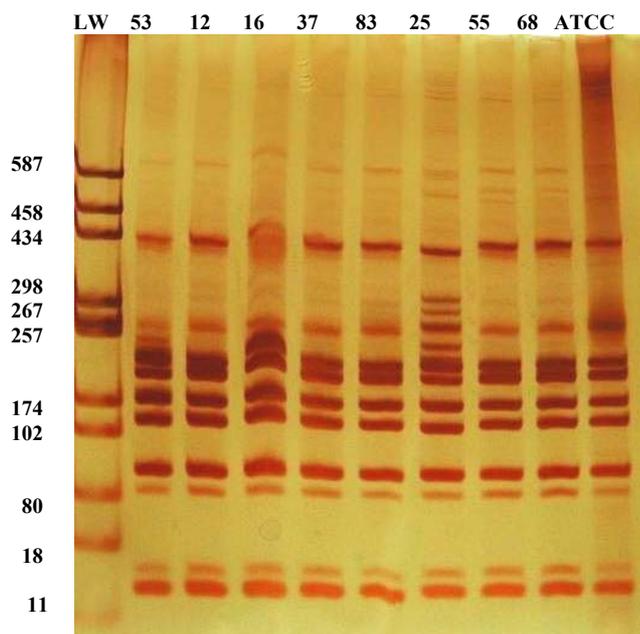


Figura 6: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Klebsiella* sp. digerido com *HaeIII*.

O perfil do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr das 14 amostras de *Staphylococcus aureus*, digerido com as enzimas *Avall* e *PstI*, permitiu identificar 3 ribotipos: um representado pela amostra 84, outro compreendendo as amostras 13, 14, 15, 34, 36, 49, 54, 56, 67, 73, 78, 88 e, por último a amostra 21 compatível com a ATCC (Figura 8).

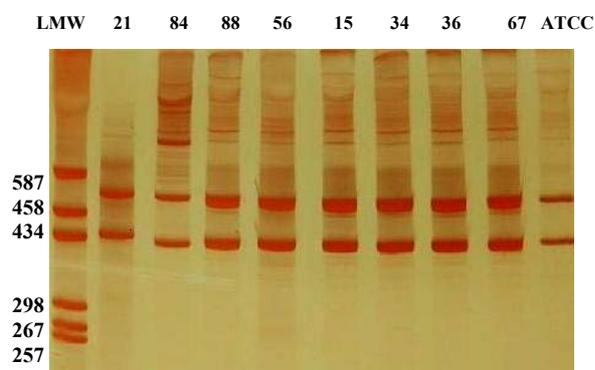


Figura 7: Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata mostrando o perfil de restrição do fragmento amplificado do gene 16S de DNAr de *Staphylococcus aureus* digerido com *Avall*.

5 – DISCUSSÃO

As doenças infecciosas, como causa importante de morbidade e mortalidade, têm se apresentado cada vez mais como grande desafio para a ciência, uma vez que, mesmo com o desenvolvimento de técnicas e equipamentos para investigação diagnóstica mais precisa e a descoberta de agentes terapêuticos específicos, essas patologias ainda exibem alta ocorrência, além dos custos elevados, entre 25% e 40% do total dos gastos para tratamentos hospitalares (RUEF, 2000).

Essa situação é preocupante nos países em desenvolvimento, pois em função de suas precárias condições sociais e econômicas, as doenças infecciosas, que são prevenidas com medidas básicas de saneamento, imunizações e boa condição nutricional, ainda apresentam altas taxas de ocorrência. Além disso, esses países exibem altos índices de doenças infecciosas de caráter oportunista e as doenças emergentes, principalmente após o aparecimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

O desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas proporcionou o aumento do número de pacientes transplantados, os quais necessitam de medidas imunossupressoras para combate à rejeição, expondo esses doentes a maiores riscos de doenças infecciosas, sobretudo a microorganismos oportunistas e cepas causadoras de infecções hospitalares. Tais fatores expressam as formas de apresentação de doenças infecciosas nos países desenvolvidos, com melhores níveis tecnológicos, econômicos e sociais, sendo, assim, esses motivos de preocupação crescente, nesses países (LACERDA, 2003).

A doença infecciosa em ambiente hospitalar assume papel de destaque, visto que, apesar de medidas preventivas, como a utilização de dispositivos descartáveis,

técnicas corretas de assepsia, lavagem rotineira das mãos e uso racional de antibióticos, entre outras, a mesma pode ocorrer. Nestes casos, sempre relacionada com fatores de risco dos próprios pacientes, dependendo de sua patologia de base, estados de imunossupressão, tratamentos com períodos de internação prolongados, procedimentos terapêuticos e de diagnósticos invasivos e condições outras clínicas desfavoráveis. Essas situações favorecem o desenvolvimento de infecções nosocomiais, tendo como agentes etiológicos bactérias com padrões de multirresistência, que compõem a microbiota do ambiente hospitalar e, além disso, essas afecções podem ser causadas pelos agentes infecciosos que fazem parte habitualmente da microbiota dos pacientes (MARTINS, 2001). Outras espécies, não avaliadas neste estudo, também têm sido identificadas como responsáveis por surtos e casos de infecção hospitalar, dentre elas identificam-se os *Enterococcus* sp, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilis* e *Clostridium difficile*, todos apresentando padrão de multirresistência aos antimicrobianos (RODRIGUES-BAÑO & PASCUAL, 2004).

As bactérias analisadas neste estudo pertencem ao grupo dos agentes que mais freqüentemente são causadores de infecções nosocomiais e também nas suas mais variadas formas de apresentação topográfica e clínica. Em estudo realizado por Ortona et al (1985) em um Hospital Universitário com 1800 leitos e taxa de infecção hospitalar de 6,7%, apresentou-se como agentes etiológicos mais freqüentes *Escherichia coli* (19,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (19,3%), *Proteus* sp. (18,4%), *Klebsiella pneumoniae* (7,8%) e *Staphylococcus aureus* (6,5%), sendo a infecção do trato urinário de maior ocorrência dos casos, até 75%, principalmente em função do uso freqüente de cateterização vesical.

No presente estudo, a média de tempo de internação dos casos que tiveram diagnóstico de infecção hospitalar foi de 28,4 dias, sendo muito superior aos casos de infecção comunitária, que foi de 10,2 dias, em média. A ocorrência de infecção nosocomial mantém os pacientes mais tempo internados, aumentando em muito a sua vulnerabilidade ao risco de adquirir outras complicações. As consequências por permanecer mais tempo internado, como a piora nos casos em que o paciente já está debilitado pelo motivo de internação hospitalar, muito freqüentemente iniciando processos de desnutrição, passando a ter a necessidade da utilização de medicamentos antibióticos de largo espectro, utilização de procedimentos invasivos e cateteres de acesso venoso central, induzem maiores riscos para complicações infecciosas. O prolongamento do tempo de internação, em razão de infecções contraídas em ambientes hospitalares, gera importantes custos extras que poderiam ser economizados e aplicados em medidas preventivas (SCHUMACHER & SCHULGEN, 1996).

As medidas de controle de infecção, desde as mais simples, como a lavagens das mãos, até procedimentos mais complexos, devem ser implementadas e ter vigilância constante. Um estudo analisando custos com infecções nosocomiais por *Staphylococcus aureus*, em unidades hospitalares, especialmente em setores de tratamento intensivo e de procedimentos cirúrgicos, demonstrou uma significativa redução nos custos financeiros após medidas técnicas de prevenção, com o objetivo de redução nos índices de infecção hospitalar, nestes estabelecimentos (KAPPSTEIN & DASCHENER, 1991). Nos Estados Unidos da América, os custos referentes aos gastos com pacientes acometidos de infecção hospitalar ultrapassam a faixa de 5 bilhões de dólares anuais (WENZEL, 1985).

Os métodos de identificação microbiológicos tradicionalmente utilizados devem seguir rigorosas normas e procedimentos, desde a forma da coleta de material, horário, local, quantidade e qualidade de material representativo do local da infecção e transporte do material ao laboratório. Uma utilização ou realização inadequada desses processos pode ocasionar falhas na identificação de agentes etiológicos infecciosos, conseqüentemente, prejudicando o tratamento a ser dispensado aos doentes (FERREIRA & SOUSA, 2000).

Os laboratórios de microbiologia, além de identificarem agentes infecciosos, auxiliam no monitoramento das populações dos agentes infecciosos e suas interações com os seres humanos, auxiliando desde a investigação clínica e diagnóstica até as medidas terapêuticas das doenças infecto-contagiosas. Para tanto, a estrutura laboratorial deve ser capaz de estabelecer informações da melhor forma de isolamento e identificação das amostras, reconhecimento da microbiota para estudos epidemiológicos, fornecimento de resultados rápidos e, para os hospitais, fornecer informações relacionadas às infecções hospitalares (BRASIL, 2004), agentes etiológicos e desta forma auxiliar o profissional médico a empregar as terapêuticas adequadas aos pacientes.

Em relação aos pacientes que evoluíram a óbito, os casos associados com infecção comunitária foram de 13 e os não associados à infecção hospitalar foram 2, em um total de 15 óbitos. Não vimos relação direta desses casos com a variabilidade genética encontrada. Em estudo epidemiológico multicêntrico, na França, onde foram avaliadas a morbidade e mortalidade hospitalar associada direta ou indiretamente com infecção hospitalar, os resultados mostraram que 6,% dos casos de morte foram diretamente atribuídos à infecção hospitalar e 26,6% dos óbitos

registrados tiveram alguma associação com infecção hospitalar (KAOUTAR et al, 2004).

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos pode ser considerado uma consequência genética inevitável da atividade humana, ao impor novos tipos de pressão seletiva sobre as populações de microorganismos. A rapidez com que as bactérias se adaptam às alterações do meio ambiente é evidenciada pela brevidade com que desenvolvem resistência a novos antibióticos (NETO et al, 2000).

Nas infecções por *Escherichia coli*, tanto nos casos de infecção hospitalar como nas comunitárias, ocorreu um predomínio de infecção urinária. Estes resultados estão de acordo com a literatura e confirmam a alta ocorrência desta bactéria nas doenças infecciosas do trato urinário. Ademais, outra bactéria Gram negativa como o *Enterobacter* sp. foi encontrada em vários casos de infecção do trato urinário no nosso estudo. Estes resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que estes dois agentes são freqüentes nas infecções do trato gênito-urinário tanto em infecção comunitária como infecção nosocomial (KOCH & ZUCOLOTTI, 2003; FOXMAN, 2003).

No presente estudo, as infecções hospitalares causadas por *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* apresentaram-se distribuídas em vários sítios topográficos. Os sítios topográficos prevalentes foram do trato urinário, de ferida cirúrgica, de infecções por acesso vascular e broncopneumonia. Estes resultados coincidem com os sítios topográficos de infecções hospitalares descritos em outros estudos (METINTAS, 2004).

No grupo dos *Staphylococcus aureus* identificados no estudo, foram relacionados principalmente com o diagnóstico de broncopneumonia e doenças na

pele, sendo esses os sítios topográficos preferenciais desse agente infeccioso. As infecções por *Staphylococcus aureus*, além de serem prevalentes em nível hospitalar, são também responsáveis por surtos de infecção hospitalar. Além disso, essa bactéria exibe níveis mais elevados de resistência aos antimicrobianos, o que, sem dúvida, é um fator agravante de grande importância.

Os estudos na Europa para acompanhamento evolutivo das cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes ou não à metilina, através de perfis de macrorestrição e RFLP, demonstram, a partir de amostras conservadas desde 1960, a presença de genes ligados à resistência desses microorganismos aos antibióticos e sua disseminação naquele continente (CRISOSTOMO et al. 2001).

Os testes de sensibilidade aos antibióticos dos agentes infecciosos realizados por meio do método de difusão em discos, aplicados em placas de ágar semeados com as amostras bacterianas e avaliadas neste estudo, revelaram padrões distintos de resistência bacteriana (Tabela 3).

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos é mediada por fatores extracromossômicos (plasmídeos e transposons) que podem ser transferidos para outros microrganismos. O padrão de resistência conferido por estes fatores envolve antibióticos de um mesmo grupo e de grupos distintos, permitindo que a seleção possa ser gerada por qualquer uma destas drogas (COUTO & PEDROSA, 1999).

Os plasmídeos são constituídos por segmentos circulares de DNA, com localização extracromossômica, capazes de se replicarem, independentemente do cromossomo bacteriano. Embora bem menores que o cromossomo bacteriano, os plasmídeos contêm a informação genética de muitas propriedades importantes para

a bactéria, entre as quais a resistência a antibióticos (plasmídeos de resistência) (BROOCKS, BUTEL & MORSE, 2000).

Em estudo realizado em 2 hospitais iranianos com nível de resistência de 42% em 182 isolados de *Enterococcus faecalis* à gentamicina, foi identificada a associação de plasmídeos conjugativos com o mecanismo de transmissão da resistência. A análise do material genético plasmideal, após clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindII*, demonstrou a variabilidade genética plasmidial, justificando a ocorrência de surtos hospitalares e a persistência de infecções por esse agente em unidades desses hospitais (FEIZABADI et al, 2004). No presente estudo não foram realizados experimentos para análise do plasmideal das amostras isoladas.

Em nosso estudo, os perfis de RFPL-PCR do segmento 16S DNAr das amostras bacterianas estudadas não permitiram correlacionar os ribotipos com a infecção comunitária ou infecção hospitalar. Dentre as amostras estudadas, sete de *Pseudomonas aeruginosa*, duas de *Klebsiella* sp e duas de *Staphylococcus aureus* apresentaram perfil de resistência bacteriana, de acordo com NCCLS. Entretanto, os perfis de restrição encontrados para estas espécies não possibilitaram correlacionar os ribotipos encontrados com os resultados de resistência a antibióticos.

A variabilidade genética do fragmento do gene 16S de DNAr das diferentes espécies de bactérias estudadas mostrou que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter* sp. apresentaram 3 ribotipos distintos e que as demais espécies apresentaram 2 ribotipos com as endonucleases de restrição utilizadas. A utilização de um maior número de enzimas de restrição possivelmente poderia revelar a existência de uma maior variabilidade genética que a observada.

No presente estudo, das 10 diferentes endonucleases de restrição utilizadas, apenas 5 foram capazes de clivar o fragmento amplificado (Tabela 3). Takahashi et al. (1998), caracterizando cepas de *Enterococcus faecalis* causadoras de surto de infecções de trato urinário em pacientes internados através da técnica de RAPD, demonstraram não apenas uma elevada variabilidade genética das amostras, mas também foram capazes de rastrear a forma de transmissão dos casos, enfatizando a utilidade desta técnica molecular nos estudos de epidemiologia hospitalar de doenças infecciosas. A utilização de métodos moleculares para a diferenciação de cepas *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina mostrou que a clivagem do DNA genômico de 45 cepas com as enzimas de restrição *HindIII* e *HaeIII* permitiu a identificação de 21 subtipos diferentes (SAVOR et al, 1998).

A utilização da amplificação do gene da região 16S DNAr, associada com técnicas de hibridização *in situ* para a detecção de infecção por estafilococos, se mostrou muito útil, sugerindo ser esta uma importante ferramenta na detecção e diferenciação desses e podendo ser também para agentes microorganismos fastidiosos (KRIMER et al, 1999). O seqüenciamento da região 16S rDNA de *Bulkholderia pseudomallei* e *Bulkholderia mallei*, duas espécies de bactéria de interesse veterinário, indicou ser um método rápido para a identificação dos agentes etiológicos quando comparado aos métodos bioquímicos microbiológicos tradicionais (GEE et al, 2003).

A região 16S rDNA tem sido utilizada como importante alvo para a detecção e identificação de bactérias em diferentes áreas. Na microbiologia do solo, por exemplo, a utilização da PCR para amplificação do gene 16S é de grande importância para o conhecimento da variabilidade de microrganismos no solo, uma vez que a maioria das bactérias presentes neste ambiente são de difícil crescimento

em meios de cultura disponíveis e, desta forma, sua detecção e identificação diretamente de amostras do solo permitem avaliar a heterogeneidade da microbiota (MACRAE, 2000). Nas diversas áreas da saúde, a utilização de métodos de análise molecular diretamente de material clínico tem auxiliado no diagnóstico, na conduta terapêutica e tem proporcionando avanços importantes nos estudos epidemiológicos. Em estudo analisando amostras de líquido, medula óssea e líquido pleural, utilizando PCR do gene 16S DNAr e análise filogenética dessas seqüências, Nikkari et al (2002) identificaram agentes não isolados por técnicas convencionais de microbiologia. Isso mostra o grande potencial das técnicas moleculares no esclarecimento de doenças infecciosas graves ou até letais, de causas não identificáveis através de técnicas convencionais.

Métodos moleculares têm sido empregados em diferentes áreas de atividade clínica, por exemplo, na área de saúde bucal, na avaliação de doenças infecciosas periodontais e na identificação dos seus agentes etiológicos microbianos. Hutter et al (2003), analisando 26 amostras da região subgingival de pacientes com periodontites e utilizando 2 pares de iniciadores para PCR da região 16S DNAr, verificaram uma grande variabilidade genética das amostras isoladas. Em estudo realizado por Frank et al (2003), mediante análise de genes do DNA ribossomal de bactérias presentes em material coletado de orelha externa, detectaram agentes causadores de infecções otorrinolaringológicas habitualmente não isolados por meios de cultivos convencionais. Os autores sugeriram que o conduto auditivo externo pode servir como reservatório para agentes infecciosos comensais e que estes agentes podem contribuir para a patogênese de infecções no ouvido médio.

Podglagen et al (2003), estudando fragmentos de tecido de válvulas cardíacas para a detecção de bactérias causadoras de endocardites infecciosas e

utilizando iniciadores dirigidos para a região 16S DNAr, observaram que o método molecular foi cerca de 20% mais sensível quando comparado aos métodos microbiológicos tradicionais. Além disso, a utilização da PCR possibilitou a identificação dos agentes infecciosos e a implementação de terapêuticas adequadas.

No presente estudo, a análise das amostras de cultura de bactérias por meio da PCR-RFLP apresentou uma variabilidade genética semelhante entre as provenientes de infecções hospitalares e as de origem comunitária, mostrando a presença destas cepas em ambos os ambientes. Da mesma forma, as cepas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* sp., que exibiram perfis de resistência aos antibióticos, foram tanto de origem comunitária como hospitalar, diferentemente das 2 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes que foram de origem intra-hospitalar.

Os resultados do presente estudo evidenciaram a presença de heterogeneidade genética em todos os 6 grupos bacterianos analisados. A possibilidade da realização desse procedimento técnico rotineiramente servirá como um importante instrumento para investigação clínica e epidemiológica, podendo ser utilizado de forma prática nos estudos de epidemiologia da infecção hospitalar.

6 – CONCLUSÕES

- O tamanho do produto amplificado do gene DNAr 16S foi idêntico para as diferentes amostras estudadas.
- A amplificação de DNAr 16S a partir de amostras de cultura mostrou-se um método simples e reproduzível.
- A PCR-RFLP mostrou diferenças marcantes na variabilidade genética das espécies estudadas.
- A caracterização das amostras permitirá a realização de estudos de epidemiologia molecular na infecção hospitalar.
- Através da ribotipagem, não foi possível estabelecer, neste estudo, a relação entre a variabilidade genética e a resistência bacteriana.
- A ribotipagem das amostras com as enzimas utilizadas não permitiu distinguir as amostras provenientes de infecção comunitária das de infecção hospitalar.
- As enzimas *Avall* e *HaeIII* apresentaram melhor perfil de restrição para a maioria dos grupos bacterianos estudados.
- A utilização de métodos moleculares como avaliação de variabilidade genética serve também como controle de qualidade aos métodos tradicionais de identificação microbiológica.

7 – PERSPECTIVAS

A caracterização das variantes genéticas das espécies de microrganismos causadores de doenças infecciosas bacterianas é extremamente importante, por vários fatores, como: perfil epidemiológico dessas patologias, apresentação clínica dessas doenças, desenvolvimento de drogas anti-infecciosas, acompanhamento e controle dos níveis de resistência desses microrganismos à terapia antibiótica.

O combate às doenças infecciosas através de medidas, tais como: boa condição nutricional, qualidade de vida, vacinas e utilização racional de antibióticos, se faz obrigatório.

As medidas profiláticas relacionadas a essas doenças passam, necessariamente, por estudos clínicos minuciosos, a disponibilidade atual dos métodos moleculares torna esse procedimento mais factível.

Os estudos de genotipagem desses agentes infecciosos, incluindo outros como vírus e fungos, devem ser realizados em unidades hospitalares individualmente, regionalmente em níveis geográficos mais abrangentes, obtendo-se, assim, dados precisos e de maneira mais rápida, podendo, dessa forma, instituir medidas racionais no controle das doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. & PEDROSO, R. Nosocomial infection in long-term care facilities. A survey in a Brazilian psychiatric hospital. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, n.6, p. 365-370, 1999.

ALMER, L. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diag. Microb. Infect. Dis.**, v. 43, p. 225–232, 2002

BAILLY, P. et al. Hospital deaths attributable to nosocomial infections: surveillance in a university hospital. **Méd. Mal. Infect.**, v. 34, n. 2, p. 76-82, 2002.

BARBOSA, H. R. & TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. São Paulo, Atheneu, 1999.

BERETTA, A. L. R. Z. et al. Use a molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital from 1991 to 2001. **J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n.9, p. 1345-1351, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 2616, de 12 de maio de 1998. Brasília, Distrito Federal, 1998.

_____. Ministério da Saúde. Epidemiologia para o controle de Infecção Hospitalar. **Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar**, Caderno A, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Distrito Federal, 2001.

_____. Ministério da Saúde. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de Saúde**, módulo V, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Distrito Federal, 2004.

BROOCKS, G. F., BUTEL, J. S. & MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CASTRO, M. e RIBEIRO, J.M.V.P. **Controle de Infecção Hospitalar**. Porto Alegre: Revinter. 1999.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin. Microb. Reviews**, V. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

CONLY, J. Antimicrobial resistance in Canada. **Canadian Med. Assoc. J.**, v 167, n. 8, p. 885-891, 2002.

COUTO, C. e PEDROSA, T. **Infecção Hospitalar – Epidemiologia e Controle**. Belo Horizonte. Medsi. 1999.

CRISOSTOMO, M. I. et al. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds en historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. **PNAS**, v. 98, n. 17, p. 9865-9870, 2001)

DEEP, A. Clinical and Microbiological profile of nosocomial infections in the pediatrics intensive care. **Indian Pediatr.**, v. 41, n. 12, p. 1238-1246, 2004.

DIAS NETO, J. et al. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cir. Bras.**, v.18, n. 5, p. 36-38, 2003.

EGGERTSON, L. & SIBBALD, B. Need for national surveillance for hospital infections. **J.A.M.C.**, v. 1, p. 171, 2004.

ELLENBERG, E. Nosocomial infection: a terminological clarification. **The Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 12, p. 721, 2004.

FEIZABADI, M. M., et al. Genetic characterization of high-level gentamicin-resistant strains of *Enterococcus faecalis* in Iran. **Can J Microbiol**, v. 50, n. 10, p. 869-872, 2004.

FERNANDES, A. T. **Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde**. São Paulo. Atheneu. 2000.

FERNANDES, S., et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella Enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, Mar./Apr. 2003, v.45, no.2, p.59-63.

FERREIRA, W.F.C & SOUSA, J. C. F. **Microbiologia**. Lisboa. Lidel, 2000.

FEY, P., et al. Molecular epidemiology in the public health and hospital environments. **Clin. Lab. Med.**, v. 23, p 885–901, 2003.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Dis. Mon.** v. 49, n. 2, p 53-70, 2003.

FRANK, D. N. et al. Culture-independent molecular analysis of microbial constituents of the healthy human outer ear. **J. Clin. Microb.**, v. 41, n. 1, p. 295-303, 2003.

FREITAS, A. N., MACHADO, D. P. & SOARES, F. S. C. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

FRIDKIN, S. & JARVIS, R. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. **Clin. Microb. Reviews**, v. 9, n. 4, p. 499–511, 1996.

GEE, J.E. et al. Use of rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. Mallei*. **J. Clin. Microb.**, v. 42, n. 10, p. 4647–4654, 2003.

GONCALVES, C. R. et al. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.42, n.1, p.1-7, 2000.

HEINZELMANN, M., SCOTT, M. & LAM, T. Factors predisposing to bacterial invasion and infection. **The Am. J. of Surgery**, v. 183, p.178-190, 2002.

HINRICHIS, S. & WISECARVER, J. **Molecular methods in diagnostic microbiology**, v. 23, p. xi-xii, 2003.

HOTA, B. Contamination, disinfection and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? **Clin. Inf. Dis.**, v. 39, n. 8, p. 1182-1189, 2004.

HOUPIKIAN, P. & RAOULT, D. traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 8 n. 2, p. 122-131, 2002.

HUTTER, G. et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clones libraries, novel phylotypes and putative pathogens. **Microbiology**, v. 149, p. 67-75, 2003.

JAYERATNE, P. & RUTHERFORD, C. Detection of clinically relevant genotypes of Vancomycin-resistant Enterococci in nosocomial Surveillance specimens by PCR. **J. Clin. Microb.**, v. 37, n. 6, p. 2090-2092, 1999.

KAOUTAR, B. et al. Nosocomial infections and hospital mortality: a multicentre epidemiology study. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, n. 4, p. 268-275, 2004.

KAPPSTEIN, I. & DASCHNER, F. D. Potential inroads to reducing hospital-acquired staphylococcal infection and its cost. **J. Hosp Infect.**, v. 19 s. b, p. 31-34, 1991.

KIMBALL'S BIOLOGY PAGES. **Transposons: Mobile DNA**. disponível em <<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Transposons>>. Acessado em 20.01.2005.

KOCH, V. H. & ZUCOLOTTO, S. M. M. infecção do trato urinário em busca de evidências. **J. Pediatr.**, V. 79 s. 1, S97-S106, 2003.

KONEMAN, E. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ª ed. Philadelphia. N.Y. Lippincott. 1997.

KRIMMER, V. et al. Detection of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in clinical samples by 16S rRNA-direct in Situ Hybridization. **J. Clin. Microb.**, v. 37, n. 8, p. 2667-2673, 1999.

LACERDA, R. A. Brazilian scientific production on nosocomial infection and nursing contribution: past, presente and perspectives. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.10, n.1, p.55-63, 2002.

_____. **Controle de Infecção em Centro Cirúrgico**. São Paulo, Atheneu, 2003.

MACRAE, A. The use of 16S rRNA methods in soil microbial ecology. **Braz. J. Microb.**, v. 31, p. 77-82, 2000.

MANFIO, G. P. **Avaliação dos estados do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP. Microbiota. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/doc/microb1.pdf>>. Acessado em 10.12.2004.

MARTINS, M. A. **Manual de infecção hospitalar**. 2ª Ed., Rio de Janeiro, Medsi, 2001.

MAYON-WHITE R. et al. An internacional survey of the prevalence of hospital acquired infection. **J. Hosp. Infection**, v. 11 (A), p 43-48, 1988.

MENDEZ, A. et al. Factores que influyen sobre la aparición de infecciones hospitalarias en los pacientes de cuidados intensivos. **Gac. Sanit.**, v. 18, n. 3, p.190-6, 2004.

METINTAS, S. Prevalence and characteristics of nosocomial infections in a Turkish university hospital. **Am. J. Infect. Control**, v. 32, n. 7, p. 409-413, 2004.

MIMS, C. et al. **Microbiologia Médica**. 2ª Ed, São Paulo, Manole Ltda,1999.

MOLLIT, D. L. Infection control, avoiding the inevitable. **Surg. Clin. of North America**, v. 82, n. 2, p. 365-378, 2002.

MONSTEIN, H. et al. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. **Microbiology**, v. 144, p. 1171-1179, 1998.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standarts for antimicrobial disk susceptibility tests; M2-A8. Approved Standard – 8a edition, 2003.

NETO, A. V. et al. **Antibióticos na prática médica**. 5ª Ed., São Paulo, Rocca, 2000.

NIKKARI, S. et al. Broad-range bacterial detection and the analyses of unexplained death and critical illness. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 2, p. 188-194, 2002.

NICHOLS, R. Surgical Wound Infection. **Am. J. Med.**, v. 91, p 54s-64s, 1991.

OLIVEIRA, R., MAFFEI, C. and MARTINEZ, R. Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. **Rev. Assoc. Med. Bras.**,v. 47, n. 3, p.231-235, 2001.

ORTIZ-HERRERA, M. et al. Caracterizacion, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. **Salud publica Del México**, v. 46, n. 2, p 149-157, 2004.

ORTONA, L. et al. A study on the incidence of nosocomial infections in a large university hospital. **Europ. J. of Epidem.**, v.1, n. 2, p. 94-99, 1985.

PELCZAR, J. M., CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2ª Ed., São Paulo, Makkon Books, v. 1, 1997.

PERSING, D. **Diagnostic molecular Microbiology – principles and Applications**. Washington D.C. ASM. 1993.

PITTET, D.. & WENZEL R.P. Nosocomial bloodstream infection in critical ill infections: excess lenght of stay, extra costs and attribulate mortality. **JAMA**. V. 271, p. 1598- 601, 1994.

PODGLAJEN, I. et al. Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 12, p. 1543-1547, 2003

RODRIGUES-BAÑO, J. & PASCUAL, A. Microorganismos multirresistentes, adquisición nosocomial o comunitaria? **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 9, p. 505-506, 2004.

RUEF, C. Nosocomial infections, múltiple fields of activity. **Infection**, v. 28, n. 6, p. 339-340, 2000.

SACCHI, C. T. et al. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 1117-1123, 2003.

SADER, H. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5 n. 4, p200-214, 2001.

SADER, H., MENDES, R., GALES, A. et al. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from the lower respiratory tract of inpatients with pneumonia in Brazilian hospitals: results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998. **J. Pneumologia**, v. 27, n.2, p.59-67, 2001.

SAMBROOK, J e RUSSEL, D. W. **A Laboratory Manual**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SARWARI, A. et al. PCR identification and automated ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care patients. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 36, n. 5, p. 342-348, 2004.

SAVOR, C. et al. Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiologic data. **J. of Clin. Microb.**, v. 36, n 11, p. 3327-3331, 1998.

SCHUMACHER, M. & SCHULGEN, G. estimation of prolongation of hospital stay attributle to nosocomial infections. **Lifetime Data Analysis**, v. 2, n. 3, p. 219-240, 1996.

S.E.S. Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina, disponível em: <www.saude.sc.gov.br/geral/orgaos_vinculados/Hospitais/hrhds/hospital.htm>. acessado em 20.01.2005.

SMITH, D. et al. Persistent colonization and the spread of resistance in nosocomial pathogens: resistance is a regional problem. **PNAS**, v. 101, n. 10, p. 3709-3714, 2004.

STAMM, A.M.N. de F. & COUTINHO, M.S.S. de A. Urinary tract infection associated with indwelling catheters: incidence and risk factors. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 45, n.1, p. 27-33, 1999.

STRANCHAN, T. E READ, A. **Genética Molecular Humana**. 2 ed. Artmed. Porto Alegre. 2002 pp 119-137.

STROHL, W. A., ROUSE, H. & FISHER, B. D., **Microbiologia Ilustrada**. São Paulo, Artmed, 2004.

TAKAHASHI, S. et al. Analysis of croos infection using genomic fingerprinting in nosocomial urinary tract infection caused by *Enterococcus faecalis*. **J. Infect. Chemother**, v. 5, p. 46-48, 1999.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª Ed., São Paulo, Atheneu, 2004.

TURRINI, R. and SANTO, A. Nosocomial infection and multiple causes of death. **J. Pediatr.**, 2002, v. 78, n. 6, p. 485-490, 2002.

UENO, M. & JORGE, A. O. C. **Comparação de técnicas moleculares de análise de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilcilina**. Disponível em: <http://www.unitau.br/prppg/publica/biocenc/downloads/comparatcmolec-N2-2002.pdf>. Acessado em 09.10.2004.

VERONESSI, R. e FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo. Atheneu. 2002.

VOET, D., VOET J. AND, PRATT CW. **Fundamentos de Bioquímica**. 1 ed. 1 reimpressão. Artmed. Porto Alegre 2002.

WENZEL, R. P. Nosocomial infections, diagnosis-related groups, and study on the efficacy of nosocomial infection control. Economic implications for hospitals under the prospective payment system. **Am. J. Med.**, v. 28, n.78, p. 3-7, 1985.

WHELEN, A. AND PERSING, D. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 349-73, 1996.

YANG, S. & ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in the acute-care settings. **The Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

Portaria nº 2616/GM em, 12 de maio de 1998

O Ministro do Estado da Saúde interino, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 87, inciso II da Constituição, e

Considerando as determinações da Lei nº 9431 de 6 de janeiro de 1997, que dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país, de Programa de Controle de Infecções Hospitalares.

Considerando que as infecções Hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais, e sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar, da vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada hospital, atinentes a seu funcionamento;

Considerando que o capítulo I artigo V e inciso III da lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990 estabelece como objetivo e atribuição do Sistema Único de Saúde (SUS), "a assistência as pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da Saúde com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas".

Considerando que no exercício da atividade fiscalizadora os órgãos estaduais de saúde deverão observar, entre outros requisitos e condições, a adoção, pela instituição prestadora de serviços, de meio de proteção capazes de evitar efeitos nocivos à saúde dos agentes, clientes, pacientes e dos circunstantes, (Decreto nº 77 052 de 19/01/1976, artigo 2º, inciso IV);

Considerando os avanços técnicos-científicos os resultados do Estudo Brasileiro da Magnitude das Infecções Hospitalares, Avaliação da Qualidade das Ações de Controle de Infecção Hospitalar o reconhecimento mundial destas ações como as que implementam a melhoria da qualidade da assistência a saúde, reduzem esforços, problemas, complicações e recursos;

Considerando a necessidade de informações e instrução oficialmente constituída para respaldar a formação técnico/profissional, resolve:

Art. 1º Expedir na forma dos anexos I, II, III, IV e V, diretrizes e normas para prevenção e o controle das infecções hospitalares.

Art. 2º As ações mínimas necessárias, a serem desenvolvidas, deliberada e sistematicamente, com vistas a redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções dos hospitais, compõe o Programa de Controle de Infecções Hospitalares.

Art. 3º A Secretaria de Política de Saúde, do Ministério da Saúde, prestará cooperação técnica as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, a fim de orientá-las sobre o exato cumprimento, interpretação das normas aprovadas por esta Portaria.

Art. 4º As Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde poderão adequar as normas conforme prevê a Constituição da República Federativa do Brasil de 1988.

Art. 5º A inobservância ou o descumprimento das normas aprovadas por esta Portaria sujeitará o infrator ao processo e as penalidades previstas na Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977, ou, outra que a substitua, com encaminhamento dos casos ou ocorrências ao Ministério Público e órgãos de defesa do consumidor para aplicação da legislação pertinente (lei nº 8078/90 ou outra que a substitua).

Art. 6º Este regulamento deve ser adotado em todo o território nacional, pelas pessoas jurídicas e físicas, de direito público e privado envolvidas nas atividades hospitalares de assistência a saúde.

Art. 7º Esta portaria entrará em vigor na data de sua publicação.

Art. 8º Fica revogada a Portaria nº 930, de 27/08/92.

BARJAS NEGRI

PUBLICADA EM DIÁRIO OFICIAL EM 13/05/98

Anexo I - ORGANIZAÇÃO

1. O Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH) é um conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente, com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares.

2. Para a adequada execução do PCIH os hospitais deverão constituir Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), órgão de assessoria à autoridade máxima da instituição e de execução das ações de controle de infecção hospitalar.

2.1 A CCIH deverá ser composta por profissionais da área de saúde, de nível superior, formalmente designados.

2.2 Os membros da CCIH serão de dois tipos: consultores e executores.

2.2.1 O presidente ou coordenador da CCIH será qualquer um dos membros da mesma, indicado pela direção do hospital.

2.3 Os membros consultores serão representantes, dos seguintes serviços:

2.3.1 - serviço médico;

2.3.2 - serviço de enfermagem;

2.3.3 - serviço de farmácia;

2.3.4 - laboratório de microbiologia;

2.3.5 - administração.

2.4. Os hospitais com número de leitos igual ou inferior a 70 (setenta) atendem os números 2.3.1 e 2.3.2.

2.5. Os membros executores da CCIH representam o Serviço de Controle de Infecção Hospitalar e, portanto, são encarregados da execução das ações programadas de controle de infecção hospitalar;

2.5.1 - Os membros executores serão, no mínimo, 2 (dois) técnicos de nível superior da área de saúde para cada 200 (duzentos) leitos ou fração deste número com carga horária diária, mínima, de 6 (seis) horas para o enfermeiro e 4 (quatro) horas para os demais profissionais.

2.5.1.1 - Um dos membros executores deve ser, preferencialmente, um enfermeiro.

2.5.1.2 - A carga horária diária, dos membros executores, deverá ser calculada na base da proporcionalidade de leitos indicado no número 2.5.1

2.5.1.3 - Nos hospitais com leitos destinados a pacientes críticos, a CCIH deverá ser acrescida de outros profissionais de nível superior da área de saúde. Os membros executores terão acrescidas 2 (duas) horas semanais de trabalho para cada 10 (dez) leitos ou fração;

2.5.1.3.1 Para fins desta Portaria, consideram-se pacientes críticos:

2.5.1.3.1.1 pacientes de terapia intensiva (adulto, pediátrico, e neonatal);

2.5.1.3.1.2 pacientes de berçário de alto risco;

2.5.1.3.1.3 pacientes queimados;

2.5.1.3.1.4 pacientes submetidos a transplantes de órgãos;

2.5.1.3.1.5 pacientes hemato-oncológicos;

2.5.1.3.1.6 pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

2.5.1.4 - Admite-se, no caso do número 2.5.1.3., o aumento do número de profissionais executores na CCIH, ou a relativa adequação de carga horária de trabalho da equipe original expressa no número 2.5.1;

2.5.1.5 - Em hospitais com regime exclusivo de internação tipo paciente -dia, deve-se atender aos números 2.1, 2.2 e 2.3, e com relação ao número 2.5.1, a carga de trabalho dos profissionais será de 2 (duas) horas diárias para o enfermeiro e 1 hora para os demais profissionais, independente do número de leitos da instituição.

2.5.1.6.- Os hospitais poderão consorciar-se no sentido da utilização recíproca de recursos técnicos, materiais e humanos, com vistas à implantação e manutenção do Programa de Controle da Infecção Hospitalar.

2.5.1.7 - os hospitais consorciados deverão constituir CCIH própria, conforme os números 2 e 2.1, com relação aos membros consultores, e prover todos os recursos necessários à sua atuação.

2.5.1.8 - O consórcio deve ser formalizado entre os hospitais componentes. Os membros executores, no consórcio, devem atender aos números 2.5.1, 2.5.1.1, 2.5.1.2, 2.5.1.3 e 2.5.1.4.

COMPETÊNCIAS

3. A CCIH do hospital deverá:

3.1 Elaborar, implementar, manter e avaliar programa de controle de infecção hospitalar, adequado às características e necessidades da instituição, contemplando, no mínimo, ações relativas a:

1. - implantação de um Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares, de acordo com o Anexo III,

3.1.2 - adequação, implementação e supervisão das normas e rotinas técnico-operacionais, visando à prevenção e controle das infecções hospitalares;

3.1.3 - capacitação do quadro de funcionários e profissionais da instituição, no que diz respeito à prevenção e controle das infecções hospitalares;

4. uso racional de antimicrobianos, germicidas e materiais médico-hospitalares;

3.2 avaliar, periódica e sistematicamente, as informações providas pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica das infecções hospitalares e aprovar as medidas de controle propostas pelos membros executores da CCIH;

3.3 realizar investigação epidemiológica de casos e surtos, sempre que indicado, e implantar medidas imediatas de controle;

4. elaborar e divulgar, regularmente, relatórios e comunicar, periodicamente, à autoridade máxima de instituição e às chefias de todos os setores do hospital a situação do controle das infecções hospitalares, promovendo seu amplo debate na comunidade hospitalar,

3.5 elaborar, implementar e supervisionar a aplicação de normas e rotinas técnico-operacionais, visando limitar a disseminação de agentes presentes nas infecções em curso no hospital, por meio de medidas de precaução e de isolamento;

6. - adequar, implementar e supervisionar a aplicação de normas e rotinas técnico-operacionais, visando à prevenção e ao tratamento das infecções hospitalares;

7. definir, em cooperação com a Comissão de Farmácia e Terapêutica, política de utilização de antimicrobianos, germicidas e materiais médico-hospitalares para a instituição;

8. cooperar com o setor de treinamento ou responsabilizar-se pelo treinamento, com vistas a obter capacitação adequada do quadro de funcionários e profissionais, no que diz respeito ao controle das infecções hospitalares;
9. elaborar regimento interno para a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar;
10. cooperar com a ação do órgão de gestão do SUS, bem como fornecer, prontamente, as informações epidemiológicas solicitadas pelas autoridades competentes;
11. notificar, na ausência de um núcleo de epidemiologia, ao organismo de gestão do SUS, os casos diagnosticados ou suspeitos de outras doenças sob Vigilância epidemiológica (notificação compulsória), atendidos em qualquer dos serviços ou unidades do hospital, e atuar cooperativamente com os serviços de saúde coletiva;
12. notificar ao Serviço de Vigilância Epidemiológica e Sanitária do organismo de gestão do SUS, os casos e surtos diagnosticados ou suspeitos de infecções associadas à utilização de insumos e/ou produtos industrializados.

4. Caberá à autoridade máxima da instituição:

4.1 - constituir formalmente a CCIH;

4.2 - nomear os componentes da CCIH por meio de ato próprio;

4.3 - propiciar a infra-estrutura necessária à correta operacionalização da CCIH;

4.4 aprovar e fazer respeitar o regimento interno da CCIH

4.5 garantir a participação do Presidente da CCIH nos órgãos colegiados deliberativos e formuladores de política da instituição, como, por exemplo, os conselhos técnicos, independente da natureza da entidade mantenedora da instituição de saúde;

6. garantir o cumprimento das recomendações formuladas pela Coordenação Municipal/Distrital de Controle de Infecção Hospitalar;

4.7 informar o órgão oficial municipal ou estadual quanto à composição da CCIH, e às alterações que venham a ocorrer;

4.8 fomentar a educação e o treinamento de todo o pessoal hospitalar.

5. À Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, do Ministério da Saúde, compete:

1. definir diretrizes de ações de controle de infecção hospitalar;
2. apoiar a descentralização das ações de prevenção e controle de infecção hospitalar;
3. coordenar as ações nacionais de prevenção e controle de infecção hospitalar;
4. estabelecer normas gerais para a prevenção e controle das infecções hospitalares;

5.5 estabelecer critérios, parâmetros e métodos para o controle de infecção hospitalar,

5.6 promover a articulação com órgãos formadores, com vistas à difusão do conteúdo de conhecimentos do controle de infecção hospitalar,

5.7 cooperar com a capacitação dos profissionais de saúde para o controle de infecção hospitalar,

5.8 identificar serviços municipais, estaduais e hospitalares para o estabelecimento de padrões técnicos de referência nacional;

5.9 prestar cooperação técnica, política e financeira aos Estados e aos Municípios, para aperfeiçoamento da sua atuação em prevenção e controle de infecção hospitalar;

5.10 acompanhar e avaliar as ações implementadas, respeitadas as competências estaduais/distrital e municipais de atuação, na prevenção e controle das infecções hospitalares;

5.11 estabelecer sistema nacional de informações sobre infecção hospitalar na área de Vigilância Epidemiológica;

5.12 estabelecer sistema de avaliação e divulgação nacional dos indicadores da magnitude e gravidade das infecções hospitalares e da qualidade das ações de seu controle;

5.13 planejar ações estratégicas em cooperação técnica com os Estados, Distrito Federal e os Municípios;

5.14 acompanhar, avaliar e divulgar os indicadores epidemiológicos de infecção hospitalar.

6. Às Coordenações Estaduais e Distrital de Controle de Infecção Hospitalar, compete:

6.1 definir diretrizes de ação estadual/distrital, baseadas na política nacional de controle de infecção hospitalar;

6.2 estabelecer normas, em caráter suplementar, para a prevenção e controle de infecção hospitalar;

6.3 descentralizar as ações de prevenção e controle de infecção hospitalar dos Municípios;

6.4 prestar apoio técnico, financeiro e político aos municípios, executando, supletivamente, ações e serviços de saúde, caso necessário;

6.5 coordenar, acompanhar, controlar e avaliar as ações de prevenção e controle de infecção hospitalar do Estado e Distrito Federal;

6.6 acompanhar, avaliar e divulgar os indicadores epidemiológicos de infecção hospitalar;

6.7 informar, sistematicamente, à Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, do Ministério da Saúde, a partir da rede distrital, municipal e hospitalar, os indicadores de infecção hospitalar estabelecidos.

7. Às Coordenações Municipais de Controle de Infecção Hospitalar, compete:

7.1 coordenar as ações de prevenção e controle de infecção hospitalar na rede hospitalar do Município;

7.2 participar do planejamento, da programação e da organização da rede regionalizada e hierarquizada do SUS, em articulação com a Coordenação Estadual de controle de infecção hospitalar;

7.3 colaborar e acompanhar os hospitais na execução das ações de controle de infecção hospitalar;

7.4 prestar apoio técnico às CCIH dos hospitais;

7.5 informar, sistematicamente, à Coordenação Estadual de controle de infecção hospitalar do seu Estado, a partir da rede hospitalar, os indicadores de infecção hospitalar estabelecidos.

Anexo II

CONCEITOS E CRITÉRIOS DIAGNOSTICOS DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

1. Conceitos básicos.

1.1 - Infecção comunitária (IC):

1.1.1 - é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.

1.1.2 São também comunitárias:

1.1.2.1 - a infecção que está associada com complicação ou extensão da infecção já presente na admissão, a menos que haja troca de microrganismos com sinais ou sintomas fortemente sugestivos da aquisição de nova infecção;

1.1.2.2 a infecção em recém-nascido, cuja aquisição por via transplacentária é conhecida ou foi comprovada e que tornou-se evidente logo após o nascimento (exemplo: herpes simples, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose, sífilis e AIDS);

1.1.2.3 as infecções de recém-nascidos associadas com bolsa rota superior a 24 (vinte e quatro) horas.

1.2 infecção hospitalar (IH):

1.2.1 é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

2. Critérios para diagnóstico de infecção hospitalar, previamente estabelecidos e descritos.

2.1 Princípios:

2.1.1 o diagnóstico das infecções hospitalares deverá valorizar informações oriundas de:

2.1.1.1 evidência clínica, derivada da observação direta do paciente ou da análise de seu prontuário;

2.1.1.2 resultados de exames de laboratório, ressaltando-se os exames microbiológicos, a pesquisa de antígenos, anticorpos e métodos de visualização.

2.1.1.3 evidências de estudos com métodos de imagem;

2.1.1.4 endoscopia;

2.1.1.5 biópsia e outros.

2.2 Critérios gerais:

2.2.1 quando, na mesma topografia em que foi diagnosticada infecção comunitária, for isolado um germe diferente, seguido do agravamento das condições clínicas do paciente, o caso deverá ser considerado como infecção hospitalar;

2.2.2 quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convencionam-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão;

2.2.3 são também convencionadas infecções hospitalares aquelas manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período;

2.2.4 as infecções no recém-nascido são hospitalares, com exceção das transmitidas de forma transplacentária e aquelas associadas a bolsa rota superior a 24 (vinte e quatro) horas;

2.2.5 os pacientes provenientes de outro hospital que se internam com infecção, são considerados portadores de infecção hospitalar do hospital de origem infecção. Nestes casos, a Coordenação Estadual/Distrital/Municipal e/ou o hospital de origem deverão ser informados para computar o episódio como infecção hospitalar naquele hospital.

3. Classificação das cirurgias por potencial de contaminação da incisão cirúrgica

3.1 as infecções pós-cirúrgicas devem ser analisadas conforme o potencial de contaminação da ferida cirúrgica, entendido como o número de microrganismos presentes no tecido a ser operado;

3.2 a classificação das cirurgias deverá ser feita no final do ato cirúrgico, pelo cirurgião, de acordo com as seguintes indicações:

3.2.1 Cirurgias Limpas - são aquelas realizadas em tecidos estéreis ou passíveis de descontaminação, na ausência de processo infeccioso e inflamatório local ou falhas técnicas grosseiras, cirurgias eletivas com cicatrização de primeira intenção e sem drenagem aberta. Cirurgias em que não ocorrem penetrações nos tratos digestivo, respiratório ou urinário;

3.2.2 Cirurgias Potencialmente Contaminadas - são aquelas realizadas em tecidos colonizados por flora microbiana pouco numerosa ou em tecidos de difícil descontaminação, na ausência de processo infeccioso e inflamatório e com falhas técnicas discretas no transoperatório. Cirurgias com drenagem aberta enquadram-se nesta categoria. Ocorre penetração nos tratos digestivo, respiratório ou urinário sem contaminação significativa.

3.2.3 Cirurgias Contaminadas - são aquelas realizadas em tecidos recentemente traumatizados e abertos, colonizados por flora bacteriana abundante, cuja descontaminação seja difícil ou impossível, bem como todas aquelas em que tenham ocorrido falhas técnicas grosseiras, na ausência de supuração local. Na presença de inflamação aguda na incisão e cicatrização de segunda intenção, ou

grande contaminação a partir do tubo digestivo. Obstrução biliar ou urinária também se incluem nesta categoria.

3.2.4 Cirurgias Infectadas - são todas as intervenções cirúrgicas realizadas em qualquer tecido ou órgão, em presença de processo infeccioso (supuração local) e/ou tecido necrótico.

Anexo III

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

1. Vigilância Epidemiológica das infecções hospitalares é a observação ativa, sistemática e contínua de sua ocorrência e de sua distribuição entre pacientes, hospitalizados ou não, e dos eventos e condições que afetam o risco de sua ocorrência, com vistas à execução oportuna das ações de prevenção e controle.

2.A CCIH deverá escolher o método de Vigilância Epidemiológica mais adequado às características do hospital à estrutura de pessoal e à natureza do risco da assistência, com base em critérios de magnitude, gravidade, redutibilidade das taxas ou custo.

2.1 São indicados os métodos prospectivos, retrospectivos e transversais, visando determinar taxas de incidência ou prevalência.

3. São recomendados os métodos de busca ativos de coleta de dados para Vigilância Epidemiológica das infecções hospitalares.

4. Todas as alterações de comportamento epidemiológico deverão ser objeto de investigação epidemiológica específica.

5. Os indicadores mais importantes a serem obtidos e analisados periodicamente no hospital e, especialmente, nos serviços de Berçário de Alto Risco, UTI (adulto/pediátrica/neonatal) Queimados, são;

5.1 Taxa de Infecção Hospitalar, calculada tomando como numerador o número de episódios de infecção hospitalar no período considerado e como denominador o total de saídas (altas, óbitos e transferências) ou entradas no mesmo período;

5.2 Taxa de Pacientes com infecção Hospitalar, calculada tomando como numerador o número de doentes que apresentaram infecção hospitalar no período considerado, e como denominador o total de saídas (altas, óbitos e transferências) ou entradas no período;

5.3 Distribuição Percentual das Infecções Hospitalares por localização topográfica no paciente, calculada tendo como numerador o número de episódios de infecção hospitalar em cada topografia, no período considerado e como denominador o número total de episódios de infecção hospitalar ocorridos no período;

5.4 Taxa de Infecções Hospitalares por Procedimento, calculada tendo como numerador o número de pacientes submetidos a um procedimento de risco que desenvolveram infecção hospitalar e como denominador o total de pacientes submetidos a este tipo de procedimento.

Exemplos:

Taxa de infecção do sítio cirúrgico, de acordo com o potencial de contaminação.

Taxa de infecção após cateterismo vesical.

Taxa de pneumonia após uso de respirador.

5.5 Recomenda-se que os indicadores epidemiológicos dos números 5, 1. e 5.2. sejam calculados utilizando-se no denominador o total de pacientes dia, no período.

5.5.1 O número de pacientes dia é obtido somando-se os dias totais de permanência de todos os pacientes no período considerado.

5.6 Recomenda-se que o indicador do número 5.4 pode ser calculado utilizando-se como denominador o número total de procedimentos dia.

5.6.1 O número de pacientes dia é obtido somando-se o total de dias de permanência do procedimento realizado no período considerado.

5.7 Outros procedimentos de risco poderão ser avaliados, sempre que a ocorrência, respectiva o indicar, da mesma forma que é de utilidade o levantamento das taxas de infecção do sítio cirúrgico, por cirurgião e por especialidade.

8. Frequência das Infecções Hospitalares por microrganismos ou por etiologias, calculada tendo como numerador o número de episódios de infecção hospitalar por microrganismo e como denominador o número de episódios de infecções hospitalares que ocorreram no período considerado.

5.9 Coeficiente de Sensibilidade aos Antimicrobianos, calculado tendo como numerador o número de cepas bacterianas de um determinado microorganismo sensível a determinado antimicrobiano e como denominador o número total de cepas testadas do mesmo agente com antibiograma realizado a partir das espécimes encontradas.

5.10 Indicadores de uso de antimicrobianos.

5.10.1 Percentual de pacientes que usaram antimicrobianos (uso profilático ou terapêutica) no período considerado. Pode ser especificado por clínica de internação. É calculado tendo como numerador o total de pacientes em uso de antimicrobiano e como denominador o número total de pacientes no período.

5.10.2 Frequência com que cada antimicrobiano é empregado em relação aos demais. É calculada tendo como numerador o total de tratamentos iniciados com determinado antimicrobiano no período, e como denominador o total de tratamentos com antimicrobianos iniciados no mesmo período.

5.11 Taxa de letalidade associada a infecção hospitalar, é calculada tendo como numerador o número de óbitos ocorridos de pacientes com infecção hospitalar no período considerado, e como denominador o número de pacientes que desenvolveram infecção hospitalar no período.

5.12 Consideram-se obrigatórias as, informações relativas aos indicadores epidemiológicos 5.1, 5.2, 5.3 e 5.11, no mínimo com relação aos serviços de Berçário de alto risco, UTI (adulto/ pediátrica/neonatal) e queimados

6. Relatórios e Notificações

6.1 A CCIH deverá elaborar periodicamente um relatório com os indicadores epidemiológicos interpretados e analisados. Esse relatório deverá ser divulgado a todos os serviços e à direção, promovendo-se seu debate na comunidade hospitalar.

6.2 O relatório deverá conter informações sobre o nível endêmico das infecções hospitalares sob vigilância e as alterações de comportamento epidemiológico detectadas, bem como as medidas de controle adotadas e os resultados obtidos.

6.3 É desejável que cada cirurgião receba, anualmente, relatório com as taxas de infecção em cirurgias limpas referentes às suas atividades, e a taxa média de infecção de cirurgias limpas entre pacientes de outros cirurgões de mesma especialidade ou equivalente.

6.4 O relatório da vigilância epidemiológica e os relatórios de investigações epidemiológicas deverão ser enviados às Coordenações Estaduais/ Distrital/Municipais e à Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar do Ministério da Saúde, conforme as normas específicas das referidas Coordenações.

Anexo IV

LAVAGEM DAS MÃOS

1. Lavagem das mãos é a fricção manual vigorosa de toda a superfície das mãos e punhos, utilizando-se sabão/detergente, seguida de enxágüe abundante em água corrente.

2. A lavagem das mãos é, isoladamente, a ação mais importante para a prevenção e controle das infecções hospitalares.

3. O uso de luvas não dispensa a lavagem das mãos antes e após contatos que envolvam mucosas, sangue outros fluidos corpóreos, secreções ou excreções.

4. A lavagem das mãos deve ser realizada tantas vezes quanto necessária, durante a assistência a um único paciente, sempre que envolver contato com diversos sítios corporais, entre cada uma das atividades.

4.1 A lavagem e anti-sepsia cirúrgica das mãos é realizada sempre antes dos procedimentos cirúrgicos.

5. A decisão para a lavagem das mãos com uso de anti-séptico deve considerar o tipo de contato, o grau de contaminação, as condições do paciente e o procedimento a ser realizado.

5.1 A lavagem das mãos com anti-séptico é recomendada em:

- realização de procedimentos invasivos;
- prestação de cuidados a pacientes críticos;
- contato direto com feridas e/ou dispositivos invasivos, tais como cateteres e drenos.

6. Devem ser empregadas medidas e recursos com o objetivo de incorporar a prática da lavagem das mãos em todos os níveis da assistência hospitalar.

6.1 A distribuição e a locação de unidades ou pias para lavagem das mãos, de forma a atender à necessidade nas diversas áreas hospitalares, além da presença dos produtos, é fundamental para a obrigatoriedade da prática.

Anexo V

RECOMENDAÇÕES GERAIS.

1 A utilização dos anti-sépticos, desinfetantes e esterilizantes seguirá as determinações da Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS)/ do Ministério da Saúde e o Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde/ MS, 2ª edição, 1994, ou outras que as complementem ou substituam.

1.1 Não são recomendadas, para a finalidade de anti-sepsia, as formulações contendo mercúrios orgânicos, acetona, quaternário de amônio, líquido de Dakin, éter e clorofórmio.

2. As normas de limpeza, desinfecção e esterilização são aquelas definidas pela publicação do Ministério da Saúde, Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde, 2ª edição, 1994 - princípios ativos liberados conforme os definidos pela Portaria d 15, SVS, de 23 de agosto de 1988, ou outras que a complementem ou substituam.

3. As normas de procedimentos na área de Microbiologia são aquelas definidas pela publicação do Ministério da Saúde - Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar, 1ª edição, 1991, ou outras que as complementem ou substituam.

4. As normas para lavanderia são aquelas definidas pela publicação do Ministério da Saúde - Manual de Lavanderia Hospitalar, 11 edição, 1986, ou outras que as complementem ou substituam.

5. A Farmácia Hospitalar seguirá as orientações contidas na publicação do Ministério da Saúde - Guia Básico para a Farmácia Hospitalar, 1ª edição, 1994, ou outras que as complementem ou substituam.

ANEXO B

Protocolo padrão para obtenção dos dados complementares a partir das amostras analisadas

Número da amostra -	Unidade internação -		
Nome paciente	Registro -		
Tipo de infecção – IC () IH () - Sítio da infecção -			
Internação	De ____ / ____ / ____ até ____ / ____ / ____		
Condição alta	Normal () Óbito ()		
Diagnósticos			
Bactéria			
Antibiograma			
Resistência			
Idade -	Sexo ()		
Fatores de risco			

Crocomo, Tarcísio

Caracterização da variabilidade genética de bactérias causadoras de infecção hospitalar e comunitária isoladas no Hospital Regional Hans Dieter Schimdt de Joinville – S.C. – Brasil. Tarcísio Crocomo – Florianópolis, 2005.

81p.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. infecção hospitalar. 2. 16S DNAr. 3. PCR – RFLP. 3. variabilidade genética.
4. bactéria.