



Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Centro de Ciências da Saúde – CCS
Departamento de Análises Clínicas- ACL
Curso de Farmácia



Caroline Ribeiro da Cunha

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA E
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS EM TRANSPORTES DE PACIENTES**

Florianópolis
2019

Caroline Ribeiro da Cunha

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA E
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS EM TRANSPORTES DE PACIENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Graduação em
Farmácia como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

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

Florianópolis
2019

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

Ribeiro da Cunha, Caroline
AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA E
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS EM TRANSPORTES DE PACIENTES /
Caroline Ribeiro da Cunha ; orientadora, Thaís Cristine
Marques Sincero, 2019.
86 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Resistência aos antimicrobianos. 3.
Validação. 4. Amostras de superfície. I. Marques Sincero,
Thaís Cristine . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Caroline Ribeiro da Cunha

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA E
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS EM TRANSPORTES DE PACIENTES**

Este trabalho foi julgado adequado para obtenção de Título de “Bacharel em Farmácia”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia.

Florianópolis, novembro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias,
Coordenador do Curso de Graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Daniela Cristina Tartari, Msc
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Jussara Kasuko Palmeiro,
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha mãe, Solange Terezinha Farias Ribeiro, que apesar de não estar mais presente ao meu lado fisicamente, esteve comigo em pensamento e foi meu grande incentivo para os momentos difíceis. Obrigada pelo exemplo de amor e carinho deixado.

Ao meu pai, Valdemar da Cunha, que soube enfrentar todas as dificuldades ao meu lado e foi o incentivador das minhas conquistas. Obrigada pelo exemplo de perseverança e luta.

À minha madrastra, Monia Charielli Pontizelli, pelo carinho e dedicação comigo e com todos ao seu redor, tua humildade te torna especial.

Aos meus irmãos, Eduardo Hosang da Cunha e Camila Ribeiro da Cunha, pela cumplicidade e apoio nos momentos em que mais precisei. Vocês foram meus primeiros amigos e se manterão pelo resto da vida.

Ao meu sobrinho, Ítalo, que será a alegria da nossa família e que já amamos muito.

À minha avó, Lucia da Cunha, pelo exemplo de mulher guerreira, que me ensinou a conquistar meus objetivos com garra e perseverança.

Ao meu noivo, Vítor Santini Müller, por ser meu braço direito em todos os momentos. Muito obrigada por seu carinho, pois ele era a força que eu precisava para seguir todos os dias motivada a conquistar meus sonhos. Te agradeço pela vida que temos juntos ao lado do nosso pequeno companheiro, Billy.

À minha amiga e companheira de trabalhos durante a faculdade, Tamires Martins. Obrigada pela amizade verdadeira durante todos esses anos.

À minha orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, por ter aceito esse desafio e por todo o conhecimento transmitido.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), em especial à Daniela Cristina Tartari, Caetana Paes Zamparette e Clarissa Feltrin, sem a ajuda de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura.

Às fundações *Bill and Melinda Gates* e FAPESC pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma me incentivaram a realizar este trabalho.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”
Cora Coralina

RESUMO

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno natural, entretanto, o maior consumo de antimicrobianos tem sido apontado como o principal responsável pelos altos níveis de resistência atuais. O trabalho desenvolvido se baseia em avaliar protocolos para coleta e extração de DNA e isolamento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA) a partir da superfície de veículos de transportes de pacientes. Foram realizados diversos testes para a determinação do kit de extração do DNA e ao mesmo tempo foi realizado o processo de identificação das colônias isoladas utilizando-se testes bioquímicos convencionais e metodologia MALDI-TOF, o que proporcionou a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) e a formação do biorrepositório com as colônias obtidas. O *swab* da linha SRK flocado da Copan Italia® para a coleta de amostras de superfície nos transportes de pacientes e o ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit foram escolhidos para a realização da extração do DNA total das amostras obtidas. Foram isoladas no total 33 colônias de veículos de transportes de pacientes das cidades de Caçador e Zortéa (SC), sendo 45% *Staphylococcus* spp., 12% *Acinetobacter* spp. e 18% *Enterococcus* spp. As bactérias isoladas são características de colonização da pele, via respiratória, do aparelho digestivo e urinário em seres humanos. Outras, apresentam colonização oriunda do solo e superfícies ambientais. Os isolados apresentaram resistência acima de 30% aos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos, as principais classes utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas. A maioria das colônias foram caracterizadas como multidroga resistentes (MDR – *multidrug-resistant*) e não foram identificados os fenótipos MLS_B e ESBL nas colônias analisadas. As características das bactérias identificadas permitem concluir que sua presença nos transportes de pacientes podem indicar de condições de higiene inadequadas.

Palavras-Chave: Resistência aos antimicrobianos; Validação; Amostras de superfície.

ABSTRACT

The development of bacterial resistance to antimicrobials is a natural phenomenon; However, the higher consumption of antimicrobials was pointed as the main responsible for the current high levels of resistance. The work developed is to evaluate protocols for DNA collection and extraction and isolation of antimicrobial resistant microorganisms (AMR) from the surface of patient transport vehicles. Several tests were performed to determine the DNA extraction kit and at the same time the identification process of the isolated colonies was performed using conventional biochemical tests and MALDI-TOF methodology, which provided the antimicrobial susceptibility test (AST) and the formation of the biorepository with the obtained colonies. The Copan Italia® SRK line swab for surface transport in patient transport and the ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit were chosen for the extraction of total DNA from the obtained samples. A total of 33 transport vehicle colonies were isolated from patients from the cities of Caçador and Zortéa (SC), being 45% *Staphylococcus* spp., 12% *Acinetobacter* spp. and 18% *Enterococcus* spp. Isolated bacteria are characteristic of colonization of the skin, respiratory, digestive and urinary tract in humans. Isolated bacteria are characteristic of colonization of the skin, respiratory, digestive and urinary tract in humans. Others have colonization from the soil and environmental surfaces. The isolates showed resistance above 30% to beta-lactams and aminoglycosides, the main classes used for the treatment of bacterial infections. Most colonies were characterized as multidrug-resistant (MDR) and MLS_B and ESBL phenotypes were not identified in the colonies analyzed.

Key Words: Antimicrobial resistance; Validation; Surface samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo do conceito de Saúde Única (<i>One Health</i>).....	22
Figura 2. Difração de raio X de uma molécula de DNA - "Foto 51".....	24
Figura 3. DNA dupla hélice.....	25
Figura 4. Componentes do DNA.....	26
Figura 5. Pareamento de bases.	26
Figura 6. Estrutura do DNA evidenciando a ligação entre as bases nitrogenadas e a orientação antiparalela.	27
Figura 7. Enovelamento do DNA com histonas para a formação dos cromossomos.....	28
Figura 8. Espectrofotometria típica de uma preparação pura de ácidos nucleicos	31
Figura 9. Espectrofotometria de ácido nucleico com a presença de 2 contaminantes.....	31
Figura 10. Espectrofotometria de ácido nucleico, comportamento gráfico dos principais contaminantes.....	32
Figura 11. Princípio do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) pela metodologia de disco-difusão.....	35
Figura 12 - Fluxograma metodológico do projeto “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”.....	37
Figura 13. Fluxograma metodológico desenvolvido.....	38
Figura 14. Localização dos municípios do estudo.	39
Figura 15. <i>Swab</i> estéril para coletas da <i>Labor import</i> [®]	40
Figura 16. <i>Swab</i> da linha SRK - flocado Copan Italia	40
Figura 17. Imagens do procedimento de coleta com <i>swabs</i> dos transportes... ..	40
Figura 18. kit ReliaPrep [™] gDNA Tissue Miniprep System da Promega [®]	41
Figura 19. Resumo do protocolo do kit ReliaPrep [™] gDNA Tissue Miniprep System/Promega [®]	43
Figura 20. Zymo BIOMICS [™] DNA Miniprep Kit [®]	43
Figura 21. A) Bead better Loccus [®] B) Tubo de lise com <i>beads</i>	44
Figura 22. Resumo do protocolo da Zymo BIOMICS [™] DNA Miniprep Kit [®]	45
Figura 23. Fluxograma simplificado para identificação de cocos Gram Positivos.	47
Figura 24 – Fluxograma simplificado para identificação de bacilos Gram Negativo.....	48
Figura 25. Ilustração da metodologia MALDI-TOF.	49
Figura 26. “Teste D”. Fenótipo MLS _B positivo.....	50
Figura 27. Teste de aproximação de discos. ESBL positiva	50
Figura 28. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do “Holder” dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho).	53
Figura 29. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do encosto dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho).. ..	54
Figura 30. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do volante dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho).. ..	55
Figura 31. Representação gráfica das absorbâncias obtidas na coleta do transporte da cidade de Zortéa.	57
Figura 32. Representação gráfica das absorbâncias obtidas na coleta do transporte da cidade de Caçador.. ..	57
Figura 33. Metodologia para formação do biorrepositório.....	59

Figura 34. Isolamento em meios Manitol salgado e MacConkey das amostras do transporte de Zortéa.....	60
Figura 35. Reisolamento das colônias dos meios MacConkey e Manitol Salgado, no meio <i>Chromagar Orientation PlastLabor</i> [®] do transporte da cidade de Zortéa.	61
Figura 36. Isolamento em meios Manitol salgado e MacConkey das amostras do transporte de Caçador..	62
Figura 37. Reisolamento das colônias dos meios MacConkey e Manitol Salgado, no meio <i>Chromagar Orientation PlastLabor</i> [®] do transporte da cidade de Caçador.	63
Figura 38. Gráfico das bactérias identificadas através de testes bioquímicos do transporte da cidade de Caçador..	69
Figura 39. Gráfico das bactérias identificadas através da metodologia MALDI-TOF do transporte da cidade de Caçador.	70
Figura 40. Gráfico das bactérias identificadas através de testes bioquímicos do transporte da cidade de Zortéa.	71
Figura 41. Gráfico das bactérias identificadas através da metodologia MALDI-TOF do transporte da cidade de Zortéa.	71
Figura 42. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) de todas as colônias analisadas.	77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Meios de cultura mais frequentemente utilizados para o isolamento bacteriano.	33
Quadro 2 . Identificação de bactérias Gram positivas isoladas do transporte da cidade de Caçador.	65
Quadro 3. Identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Caçador.	66
Quadro 4 - Identificação de bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Caçador.	66
Quadro 5. Identificação de bactérias Gram positivas isoladas do transporte da cidade de Zortéa.	67
Quadro 6. Identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Zortéa.	68
Quadro 7. Identificação de bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Zortéa.	68
Quadro 8. Quadro do teste de sensibilidade realizado para amostras do transporte da cidade de Caçador..	74
Quadro 9. Quadro do teste de sensibilidade realizado para amostras do transporte da cidade de Zortéa..	75
Tabela 1. Valores de absorvância do DNA obtido com os protocolos 1 e 2.	52
Tabela 2. Valores de absorvância das cidades de Zortéa e Caçador..	56
Tabela 3. Análise quantitativa de bactérias resistentes e sensíveis aos antimicrobianos testados, para o transporte da cidade de Caçador e Zortéa. ...	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS - Ágar sangue	MIC - Concentração Inibitória Mínima
BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	MIMA - Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
BHI - Brain heart infusion	MLS_B - Macrolide-lincosamide-streptogramin B
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	MRA - Microrganismo Resistente aos Antimicrobianos
CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	MRSA - Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CHOC - Ágar-Chocolate	OMS - Organização Mundial da Saúde
CLED - Cystine Lactose Eletrolyte Deficiente Agar	ONT - Oxford Nanopore Technologies
CROMO - Cromoágar	PacBio - Pacific Biosciences
ddNTPs - Didesoxirribonucleotídeos	PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	PIB - Produto Interno Bruto
DNAr – DNA Ribossomal	SBS - Sequenciamento por síntese
DNase - Desoxirribonuclease	Sisgen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Trifosfato	SS - Salmonella-Shigella Agar
ESBL – Beta Lactamase de Espectro Estendido	TSA - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
gDNA - DNA Genômico	UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
HGP - Projeto do Genoma Humano	VRE - <i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina
HU - Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago	WHO - World Health Organization
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	
RNA - Ácido Ribonucleico	
rRNA - RNA Ribossomal	
MALDI-TOLF - <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time of flight</i>	
MC – MacConkey Agar	

LISTA DE SÍMBOLOS

Grandeza	Unidade	Símbolo
Volume	Microlitros	μl
Tempo	Minutos	Min
Temperatura	Graus celsius	$^{\circ}\text{C}$
Massa	Nanogramas	ng
Acidez/basicidade	Potencial Hidrogênico	pH
Aceleração da gravidade	ms^2	g
Distância	Nanômetro	nm
Proporção	Porcentagem	%

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2	HIPÓTESE.....	19
3	OBJETIVO.....	19
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
4.1	MICROORGANISMOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS (MRA).....	20
4.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA..	21
4.3	ESTRUTURA DA DUPLA HÉLICE DE DNA.....	23
4.4	METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE DNA.....	27
4.4.1	EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE PUREZA.....	29
4.6	PROCESSAMENTO DE BACTÉRIAS EM CULTURAS.....	32
4.7	IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS A PARTIR DE TESTES BIOQUÍMICOS E COLORAÇÃO DE GRAM.....	34
4.8	IDENTIFICAÇÃO DE MRA PELA TÉCNICA DE TSA.....	34
5	METODOLOGIA.....	36
5.1	ESTRATÉGIA.....	38
5.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	39
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
5.4	QUANTIFICAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DE PUREZA.....	45
5.5	ISOLAMENTO DE MRA E CONSTRUÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO.....	46
5.6	IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS.....	46
5.7	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA MALDI-TOF.....	48
5.8	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA).....	49
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6.1	PADRONIZAÇÃO DA COLETA DE SWABS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	51
6.2	COLETA DOS TRANSPORTES PARA APLICAÇÃO DO PROTOCOLO 2.....	56
6.3	ISOLAMENTO DE MRA E FORMAÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO....	58
6.3.2	IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS E METODOLOGIA MALDI-TOF DAS COLÔNIAS OBTIDAS.....	64
6.4	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA).....	72
7	CONCLUSÃO.....	79
8	SUGESTÕES.....	80

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos é considerada um dos problemas de saúde pública mais relevantes mundialmente, já que muitas bactérias deixaram de responder aos efeitos desses fármacos (WHO, 2005). O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno natural; entretanto, o maior consumo de antimicrobianos tem sido apontado como o principal responsável pelos altos níveis de resistência atuais (WHO, 2015)

A resistência microbiana se apresenta de forma progressiva na sociedade, através da transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, patogênicos e não patogênicos, destacando-se quando relacionado a diferentes ambientes, principalmente no meio hospitalar e em seus usuários, onde apresenta uma situação de ameaça ao conjunto terapêutico para o tratamento de diversas infecções (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

As consequências clínicas e econômicas da resistência aos antibacterianos são graves e se relacionam com o aumento da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas. Por sua vez, a hospitalização prolongada e o uso de diferentes antimicrobianos aumenta os custos dos cuidados de saúde, o que constitui um problema relevante, devido os recursos destinados aos sistemas de saúde e a conjuntura econômica e financeira do país (LOUREIRO *et al.*, 2016).

Estima-se que cerca de 700 mil pessoas morrem por ano devido a infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA), o que causa um custo econômico considerável, além do custo humano imensurável. É avaliado um aumento contínuo da resistência bacteriana até 2050, que poderá levar 10 milhões de pessoas a morte, ou seja, uma morte a cada três segundos e uma redução de 2% a 3,5% no Produto Interno Bruto (PIB). O custo mundial estimado é de até 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2014).

Atualmente o cenário brasileiro, e de outros países em desenvolvimento, é de poucos recursos empregados na monitorização de ações sobre o uso racional de antimicrobianos. Além disso, apresenta dados limitados sobre o uso desses medicamentos em hospitais (CASTRO *et al.*, 2002). No

ambiente hospitalar a terapia antimicrobiana é rotineira, e as cepas multirresistentes são selecionadas e propagadas com mais facilidade (ROCHA; CARNEIRO; CASTILHO, 2009), além de prejudicar o paciente que o utiliza, atinge também a microbiota ambiental do hospital, o que contribui para o aumento da morbidade, mortalidade, prolongamento no tempo de internação e provocando a elevação nos custos do tratamento, tanto do paciente quanto de todos os demais usuários do hospital (CARNEIRO *et al.*, 2011). No campo econômico, a resistência bacteriana afeta de forma diferente os diversos envolvidos na utilização desses medicamentos, principalmente o paciente, que tem o custo da doença não solucionada, necessitando de fármacos alternativos, muitas vezes de valores mais elevados (CARNEIRO *et al.*, 2011).

Atualmente se observa um cenário de utilização pouco criteriosa e/ou em larga escala dos antimicrobianos, especialmente como promotores de crescimento na criação de animais e na medicina veterinária. O uso irracional de antimicrobianos na medicina veterinária, bem como a necessidade de controle de seu uso, torna-se um problema ainda maior quando usado em animais de produção de alimentos. Neste caso, é possível que quantidades mínimas de antimicrobianos e seus metabólitos, que permanecem nos tecidos comestíveis ou em produtos de origem animal, estimulem certos efeitos nocivos em seres humanos, que são os potenciais consumidores de tais alimentos (BARROS, 2013). Para evitar tais riscos, é necessário usar medicamentos racionalmente, ou seja, usá-los apenas quando eles são realmente indicados e de maneira adequada (ADAMS, 2003; QUESSADA, 2012).

Segundo, a World Health Organization - WHO (2015) diferentes setores, incluindo medicina humana e veterinária, agricultura, finanças, meio ambiente e consumidores devem estabelecer ações para combater a resistência antimicrobiana. Nesse sentido foi criado o conceito de “*one health*” – Saúde Única, o qual se baseia na implementação do pensamento contemporâneo sobre saúde e ecossistemas e sua relevância para o desenvolvimento global da saúde pública e animal, o qual reduzirá os riscos de doenças infecciosas entre animais e ecossistemas humanos (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

Atualmente a resistência aos antimicrobianos se apresenta de forma progressiva na sociedade através da transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, patogênicos e não patogênicos. Esse cenário é

evidente quando se relaciona ambientes, principalmente o meio hospitalar, e seus usuários onde se apresenta uma situação de ameaça ao conjunto terapêutico para o tratamento de diversas infecções (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

O diretor adjunto da Organização Mundial da Saúde (OMS), Keiji Fukuda, em tradução livre de *World Health Organization*, ressalta a necessidade de maiores estudos para MRA:

Sem uma ação urgente e coordenada de muitas partes interessadas, o mundo caminha para uma era pós-antibiótica, na qual infecções comuns e ferimentos leves que puderam ser tratados por décadas podem mais uma vez matar (ORGANIZATION, 2014).

Considerando o exposto acima, percebe-se que resistência aos antimicrobianos e a transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, patogênicos e não patogênicos, bem como entre diferentes ambientes, comunitários, hospitalares e de criação animal, é um fenômeno altamente dinâmico, crescente e que tem ameaçado o arsenal terapêutico disponível para tratamento de infecções por MRA. O presente projeto é parte fundamental para a avaliação da metodologia a ser utilizada no projeto vinculado (“Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”), que visa avaliar a circulação de MRA entre o oeste do estado de Santa Catarina - região de alta produção de suínos e aves, e conseqüentemente com elevada utilização de antimicrobianos - e o Hospital Unversitário da UFSC através da análise por metagenômica e cultura convencional de veículos utilizados no transporte de pacientes entre as duas regiões.

2 HIPÓTESE

O método proposto é eficaz para o rastreio de MRA em veículos de transporte de pacientes.

3 OBJETIVO

Avaliar protocolos para coleta e extração de DNA e isolamento de MRA a partir da superfície de veículos de transportes de pacientes

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Padronizar a coleta de *swabs* de superfícies em veículos de transporte de pacientes;
- 2) Avaliar os protocolos para extração de DNA total a partir de *swabs*;
- 3) Estabelecer um fluxograma para processamento e isolamento de MRA;
- 4) Identificar as colônias obtidas;
- 5) Realizar o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) das bactérias isoladas;

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS (MRA)

Em 1928, *Alexander Fleming* identificou o fenômeno de inibição de crescimento de bactérias ocasionado pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (antes *P. notatum*), o qual daria origem à penicilina, o primeiro antibiótico usado com sucesso no tratamento de infecções causadas por bactérias (FIORAVANTI, 2010).

A descoberta de *Fleming* não interessou aos pesquisadores da época, pois a penicilina não era produzida em quantidade suficiente para o tratamento de todos os pacientes. Apenas com a Segunda Guerra Mundial, em 1939, que os cientistas *Howard Florey* e *Ernst Chain*, conseguiram produzir penicilina em escala industrial, através dos estudos realizados por *Fleming*. Todos os pesquisadores envolvidos receberam o Prêmio Nobel de Medicina em 1945 (HARE, 1982).

Nas últimas décadas do século XX, a redução drástica da mortalidade causada por doenças infecciosas ocorreu pelo desenvolvimento de fármacos eficientes no combate aos patógenos causadores dessas doenças (RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, 2001). Por outro lado, o aparecimento de resistência bacteriana, em que as bactérias desenvolvem defesas relativas aos fármacos antibacterianos, é consequência da disseminação do uso desses próprios fármacos (VARALDO, 2002).

A resistência bacteriana de impacto clínico tem sido observada desde o uso extensivo da penicilina após a Segunda Guerra Mundial (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014), quando houve o surgimento das primeiras cepas de bactérias resistentes ao fármaco, e continua ocorrendo a cada antibacteriano que foi introduzido para o tratamento humano e veterinário.

Nos últimos anos, observou-se um rápido crescimento de isolados clínicos resistentes a antimicrobianos, em conjunto com a diminuição da taxa de desenvolvimento de novas moléculas. Essa realidade representa um aumento da morbidade e taxas de mortalidades relacionadas a doenças infecciosas com níveis semelhantes aos observados em doenças presentes antes da era dos antimicrobianos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

A disseminação desses microrganismos já é conhecida em todo o mundo. Segundo O'Neill (2014) os MRA são causadores de pelo menos 50.000 mortes a cada ano em toda a Europa e Estados Unidos, e outras milhares de mortes em outras áreas do mundo. Globalmente há uma grande variação na prevalência dos diferentes MRA, entretanto, o assunto é uma preocupação mundial, independente do nível de renda e desenvolvimento de cada país (O'NEILL, 2014).

A resistência aos antimicrobianos pode ser classificada em três tipos: intrínseca; adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende a presença de características próprias do microrganismo que limitam a ação dos antimicrobianos. Como exemplo: presença de membrana externa com baixa permeabilidade, ou, as bombas de efluxo constitutivas observadas em muitas bactérias. O segundo tipo, é a resistência adquirida, em que um microrganismo, inicialmente sensível ao antimicrobiano, pode tornar-se resistente pela incorporação de novo material genético (plasmídeos, transposons, integrons, cassetes gênicos, entre outros.) ou como resultado de mutações. E o terceiro tipo, a resistência adaptativa, a qual envolve um aumento temporário na capacidade de uma bactéria para sobreviver à ação do antimicrobiano devido a alterações na expressão de genes e / ou proteínas, ocasionadas pela exposição a um desencadeador ambiental, por exemplo, estresse, condições de nutrientes, estado de crescimento, e níveis subinibitórios dos próprios antimicrobianos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

4.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA

A resistência aos antimicrobianos foi considerada durante muitos anos como um problema de saúde mundial. Atualmente, foi elencada por inúmeras organizações mundiais de saúde como um dos principais desafios de saúde do século XXI (MARSHALL; LEVY, 2011).

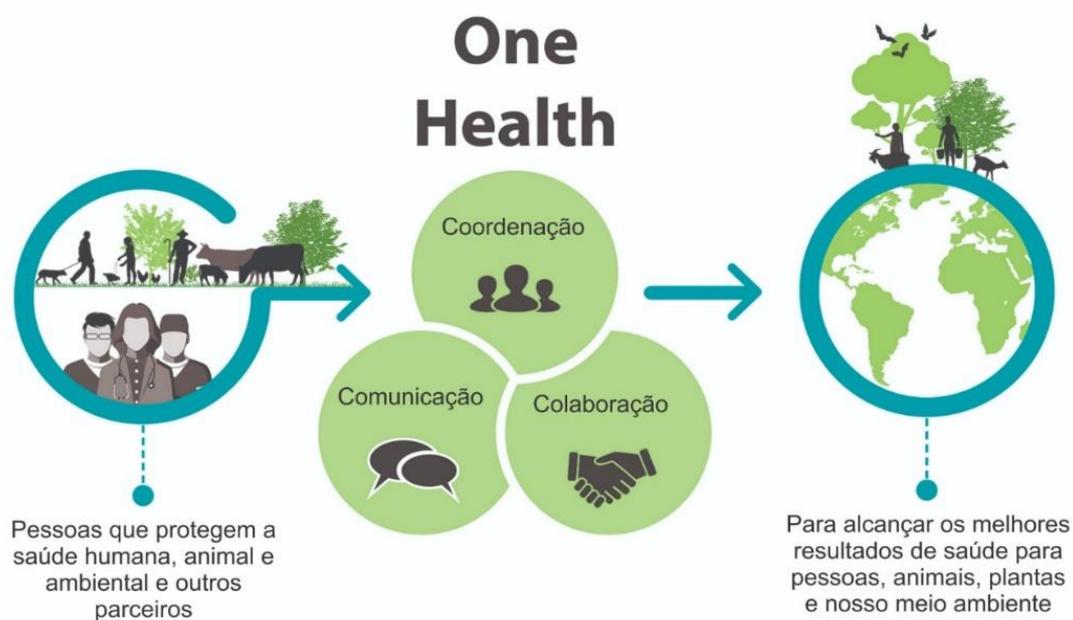
As doenças infecciosas presentes em animais e que podem ser transmitidas aos humanos (zoonoses) tem seu crescimento relacionado a diversos fatores. Estima-se que cerca de 60% das recentes doenças humanas

sejam originárias de animais (MWANGI; DE FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016).

O crescimento da economia global permitiu a rápida disseminação de pessoas, animais, plantas e produtos agrícolas em todo o mundo, contribuindo para o aparecimento de surtos de doenças zoonóticas e infecções em populações carentes (SMITH *et al.*, 2014). Logo, se vê necessário o pensamento sobre a saúde a partir de uma perspectiva integrada, ou seja, que envolva o conhecimento de fatores humanos, animais e ambientais (MWANGI; DE FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016).

Recentemente, ocorre o interesse de integrar diferentes campos profissionais, os quais incorporam as ciências ambientais, a partir do conceito de “*One Health*”- Saúde Única, a qual é definida como uma iniciativa interdisciplinar que propõe a gestão do bem-estar humano, animal e ambiental (MWANGI; DE FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016). Para isso as fronteiras tradicionais da prática médica e veterinária devem ser ultrapassadas (ATLAS, 2012), tal conceito é ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1 – Modelo do conceito de Saúde Única (*One Health*). Fonte: adaptado de (CDC, 2019).



Dados de censos oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010) apontam que em 1950 a população brasileira era 36,16% como urbana e, em 2010 esse valor aumentou para 84,36%.

Grande parte da população vive em centros urbanos, o que possibilita a transmissão de doenças em áreas peri-urbanas ou urbanas, devido à emergência ou re-emergência de seus vetores nessas áreas (TAUIL, 2006).

No Brasil, para o controle de doenças transmitidas por vetores deve-se levar em consideração três aspectos: 1) urbanização da população; 2) transformação do caráter da doença entre o meio rural e o urbano; 3) descentralização do controle para municípios (TAUIL, 2006).

A rápida urbanização acarreta a redução da qualidade sanitária das cidades, com conseqüente aumento de transmissão de várias doenças infecciosas e precarização do atendimento hospitalar.

No ambiente hospitalar é essencial apresentar abordagens inovadoras pela equipe de saúde, que permitam melhorar a assistência ao paciente e promover ambientes saudáveis para todos (RABINOWITZ *et al.*, 2017).

Pacientes hospitalizados são mais propensos a adquirirem possíveis infecções, pois apresentam geralmente algum grau de imunocomprometimento e estão sujeitos a diversas terapias medicamentosas e/ou procedimentos invasivos (DE QUEIROZ, 2004). Logo, é essencial que em ambiente hospitalar haja maior controle e prevenção da disseminação de bactérias multirresistentes que podem dificultar ainda mais o tratamento.

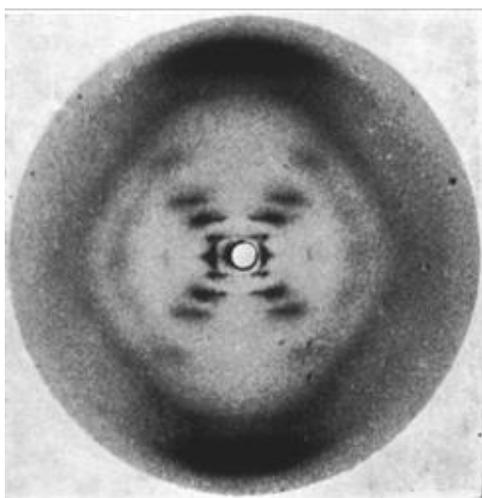
Ressaltando a importância da saúde única dentro de um serviço de saúde brasileiro, Fontana (2010) relata a presença de formigas no meio hospitalar e que essas seriam importantes causadoras da disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente estudado.

4.3 ESTRUTURA DA DUPLA HÉLICE DE DNA

Várias ferramentas avançadas de pesquisa foram utilizadas para a descoberta da estrutura do DNA, incluindo a cristalografia de difração de raio X,

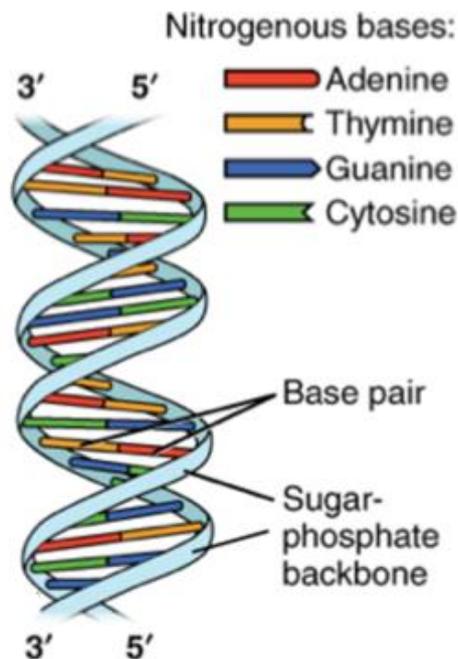
a qual se baseia na passagem de raios X através dos cristais de uma substância. A geometria única de um cristal, em termos de seu conteúdo atômico, causava a difração ou curva dos feixes de raio X, à medida que eles a atravessavam. Os padrões de difração obtidos, com pontos, linhas e borrões, eram capturados em filme fotográfico, como realizado no trabalho de *Rosalind Franklin* em 1953, o qual apresenta a “foto 51”, que se tornou a chave para a futura descoberta da estrutura do DNA (ELKIN, 2003), conforme **Figura 2**.

Figura 2. Difração de raio X de uma molécula de DNA - "Foto 51". Fonte: (CIB, 2016)



James D. Watson e *Francis Crick* (1953), com base no trabalho de *Rosalind Franklin*, relataram pela primeira vez que a estrutura do DNA se apresentava disposta em dupla hélice a qual é composta por três tipos de componentes químicos: o fosfato, um açúcar (desoxirribose) e quatro bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina), conforme **Figura 3**, como é descrito e analisado por Commoner (1968). O relato da estrutura do DNA possibilitou aos autores o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1962.

Figura 3. DNA dupla hélice. Fonte: (KHAN ACADEMY, 2019)



A estrutura química da molécula de dupla hélice é composta por um grupo OH livre ligado ao carbono 3' terminal e uma molécula de fosfato, de carga negativa o qual se liga ao átomo carbono de número 5' da desoxirribose (açúcar). As bases nitrogenadas presentes são formadas de anéis de carbono e nitrogênio. As bases citosina (C) e timina (T) são formadas por um anel de carbono, enquanto as bases adenina (A) e guanina (G), por dois anéis de carbono e nitrogênio. A ligação de uma base ao carbono 1' do açúcar forma o nucleotídeo completo, conforme **Figura 4**.

A ligação entre os nucleotídeos adenina e timina se faz por duas pontes de hidrogênio enquanto a ligação entre citosina e guanina apresenta três pontes de hidrogênio (ROSELINO, 2008). A estrutura da dupla hélice pode ser representada pela **Figura 5**.

Figura 4. Componentes do DNA. Fonte: (KHAN ACADEMY, 2019)

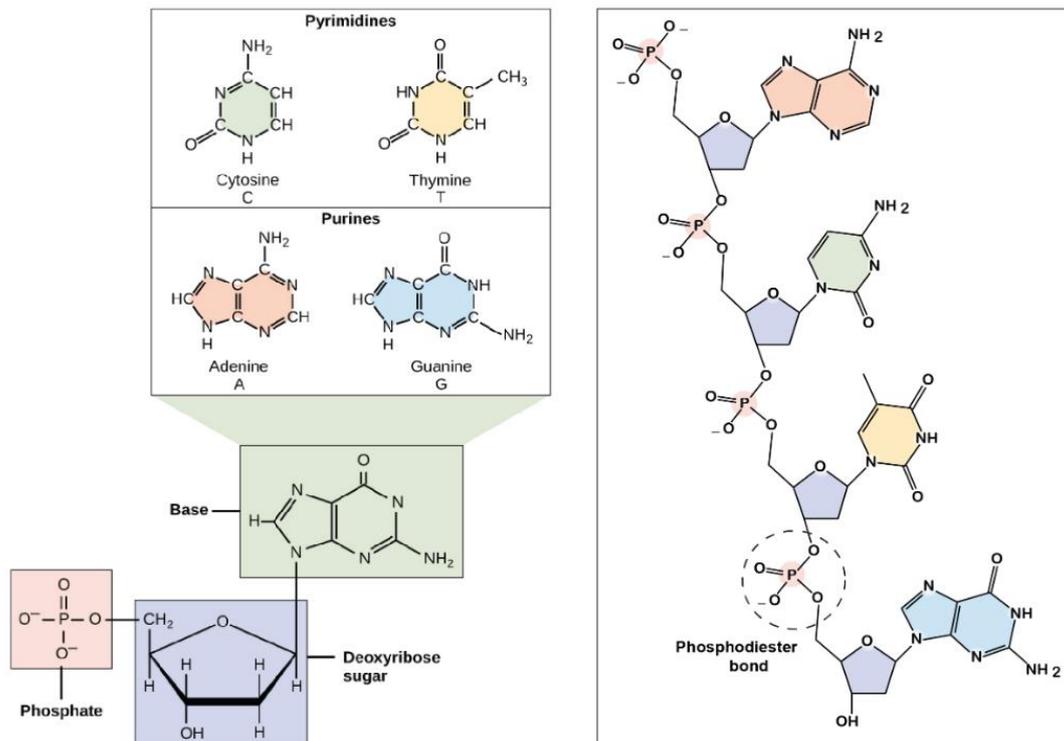
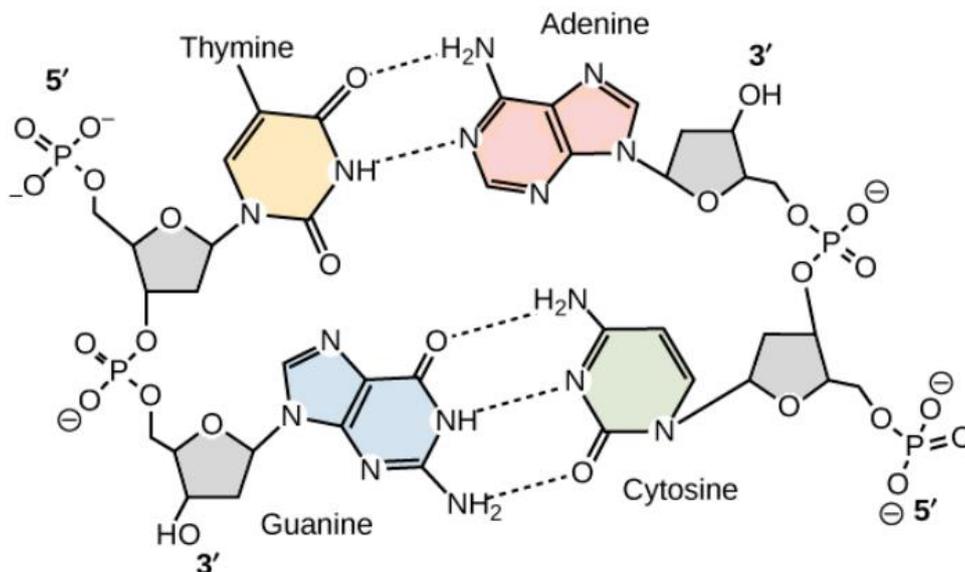


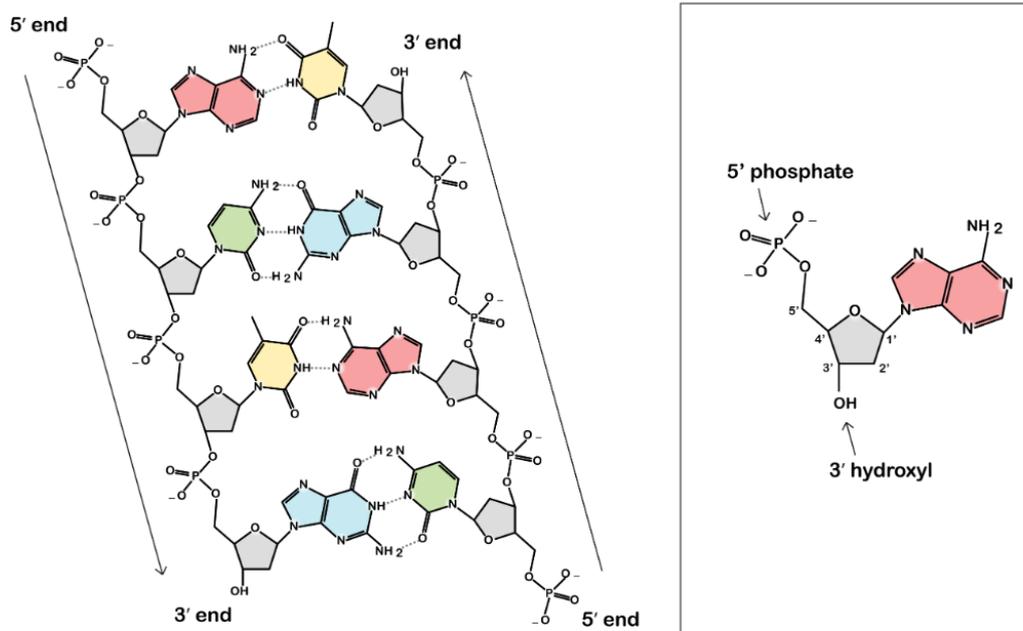
Figura 5. Pareamento de bases. Fonte: (KHAN ACADEMY, 2019)



O DNA de fita dupla é uma estrutura que apresenta uma orientação antiparalela, ou seja, é composta de duas fitas que correm lado a lado mas com direções opostas. Em uma molécula de DNA de fita dupla, a extremidade 5' (com fóstato livre) de uma fita se alinha com a extremidade 3'

(com hidroxila livre) da seguinte molécula, e vice-versa (AMBRUS *et al.*, 2006), conforme **Figura 6**.

Figura 6. Estrutura do DNA evidenciando a ligação entre as bases nitrogenadas e a orientação antiparalela. Fonte:(KHAN ACADEMY, 2019)



A descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA se tornou de extrema importância para a ciência, como demonstrado por (STRASSER, 2003), que ressalta o desenvolvimento do Projeto Genoma Humano a partir do DNA. Portanto, a partir dela pode-se determinar a sequência de pares de nucleotídeos e assim determinar a sequência de aminoácidos formadores do DNA e com isso descrever o código genético.

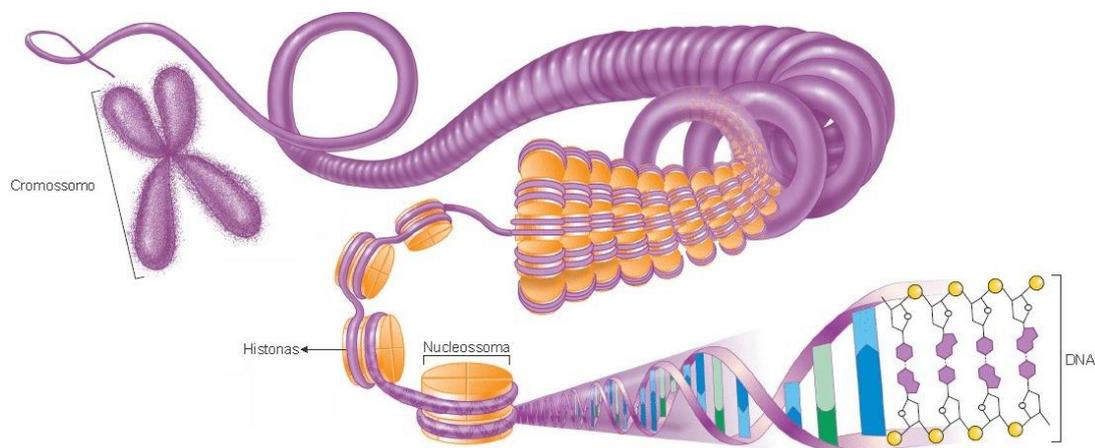
4.4 METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE DNA

4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA apresenta carga negativa devido à existência dos grupos fosfatos, quando esse é desenrolado sofre ação do magnésio presente na célula para sua estabilização. O DNA é organizado em cromossomos, em parte, enrolando-se em torno de proteínas carregadas positivamente (histonas) para a formação de nucleossomas, como ilustrado na **Figura 7**. O magnésio também é

essencial para a função das proteases (proteínas enzimáticas que lisam o DNA) (ELKINS, 2013).

Figura 7. Enovelamento do DNA com histonas para a formação dos cromossomos. Fonte: adaptado de (FOX, 2016)



Devido à estrutura lipídica da membrana celular, a presença de proteases e magnésio e o enrolamento do DNA em torno das histonas, muitos dos procedimentos de extração de DNA possuem elementos comuns. Logo, o procedimento de extração segue três etapas básicas: 1) Lise (rompimento das células); 2) Separação do DNA dos outros componentes da célula; 3) Isolamento do DNA (ELKINS, 2013).

Para os diversos tipos de amostras existem vários protocolos e kits comerciais que podem ser adaptados para a extração do DNA. Para cada amostra podem ser testadas adaptações, dependendo das características presentes em cada espécie a ser analisada. O protocolo a ser seguido deve proporcionar a obtenção de amostras de alta pureza. A grande dificuldade verificada em alguns casos é que, quando se extrai DNA de uma amostra, existe a mistura de ácidos nucleicos do hospedeiro e de outros microrganismos que podem estar presentes no tecido (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Portanto, a extração de DNA tem como objetivo obter moléculas de DNA isoladas com um elevado grau de pureza. Para isso, o método se inicia com a utilização de uma solução de lise (detergente) que atua de diferentes formas, como no rompimento da membrana celular e liberação do conteúdo celular (lise), remoção das proteínas e dos restos celulares, precipitação dos ácidos nucleicos e remoção enzimática do RNA (REGITANO, 2001). Em seguida, ocorre a

remoção das proteínas celulares precipitadas, a precipitação e lavagem do DNA obtido com álcool e, por fim, a eluição do DNA obtido.

Novas tecnologias foram desenvolvidas para a extração de DNA, especialmente com a utilização de colunas de sílica e reagentes não orgânicos, os quais são descritos e analisados por Boom e colaboradores (1990), Sambrook, Russell e Russell (2001), Teles Caldart e colaboradores (2011) e Chen e colaboradores (2016). A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de fatores como o tipo de amostra a ser utilizada, grau de pureza e de integridade (BARTLETT; WHITE, 2003).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE PUREZA

Ácidos nucleicos absorvem luz UV na faixa de 260nm, sendo que cada unidade de absorbância corresponde a 50ng de DNA e 40ng de RNA. A pureza do DNA é obtida a partir de uma análise espectrofotométrica em uma faixa de absorção de 200- 1100 nm. A razão de absorbância a 260nm e 280 nm é usada para avaliar a pureza do DNA e RNA em relação a proteínas que absorvem na faixa de 280nm e outros compostos orgânicos que absorvem na faixa de 230nm (BIOCHROM, 2015). A **Figura 8** representa a espectrofotometria típica de ácidos nucleicos.

Em 1942, *Warburg* e Christian relataram que a proporção A_{260}/A_{280} poderia ser utilizada para avaliar a contaminação durante a purificação de proteínas. O ácido nucleico apresenta alta extensão molecular em 260nm e 280 nm em comparação a proteína, assim, tornando a proporção A_{260}/A_{280} um indicador sensível da contaminação de uma preparação de ácidos nucleicos com proteínas (WILFINGER; MACKEY; CHOMCZYNSKI, 1997).

Para avaliar com precisão a qualidade da amostra, as proporções A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} devem ser analisadas em combinação com a qualidade do espectrofotômetro. Ácidos nucleicos pouco contaminados normalmente produzem uma relação A_{260}/A_{280} entre 1,7 e 1,9 para DNA e entre 1,8 e 2,0 para RNA. Essas relações dependem do pH e força iônica da solução usada como branco. Relações de pureza significativamente diferentes podem indicar a presença de RNA, fenol ou outros contaminantes, conforme **Figura 9** e **Figura**

10. Uma segunda medida de pureza do DNA é a partir da relação A260/230 permanecendo na faixa de 1,8- 2,2. Relações de pureza significativamente inferiores aos valores desejados, podem indicar que a técnica de extração deve ser otimizada, pois há contaminação por fenol, EDTA e/ou carboidratos (AU - DESJARDINS; AU - CONKLIN, 2010).

Figura 8. Espectrofotometria típica de uma preparação pura de ácidos nucleicos. Fonte: adaptado de (AU - DESJARDINS; AU - CONKLIN, 2010)

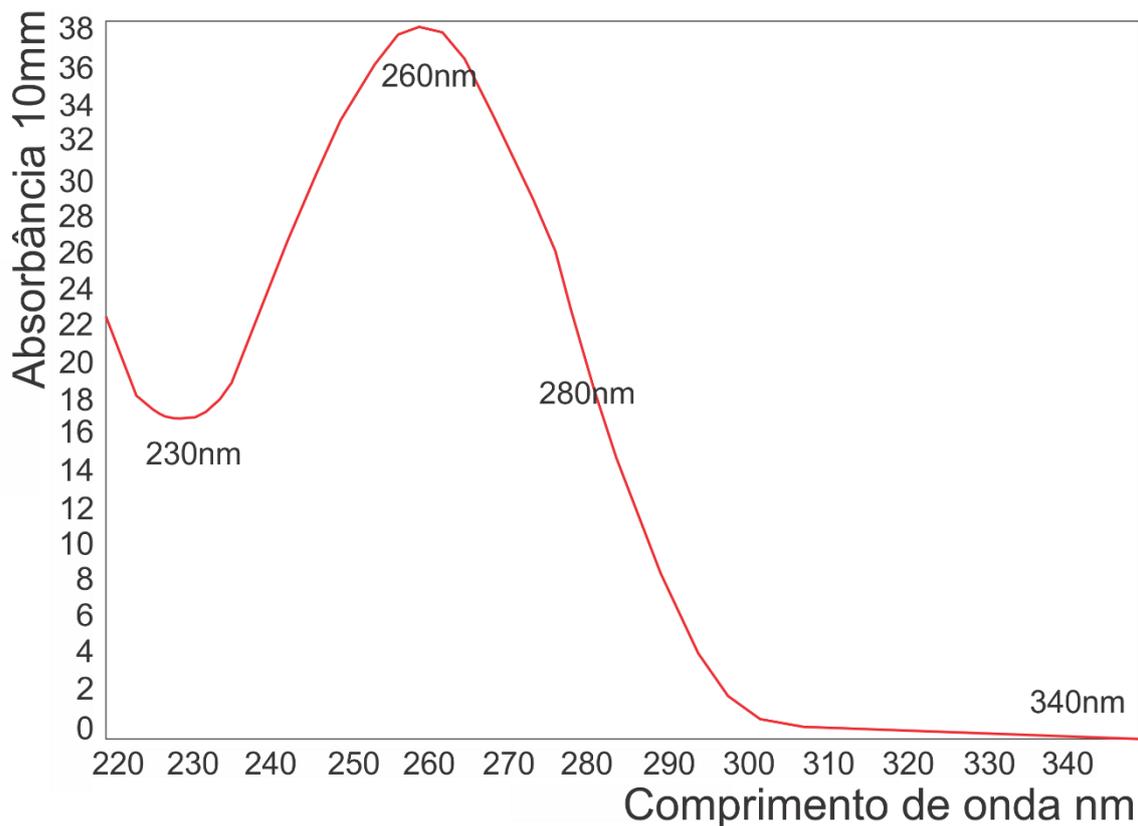


Figura 9. Espectrofotometria de ácido nucleico com a presença de 2 contaminantes. Fonte: adaptado de (AU - DESJARDINS; AU - CONKLIN, 2010)

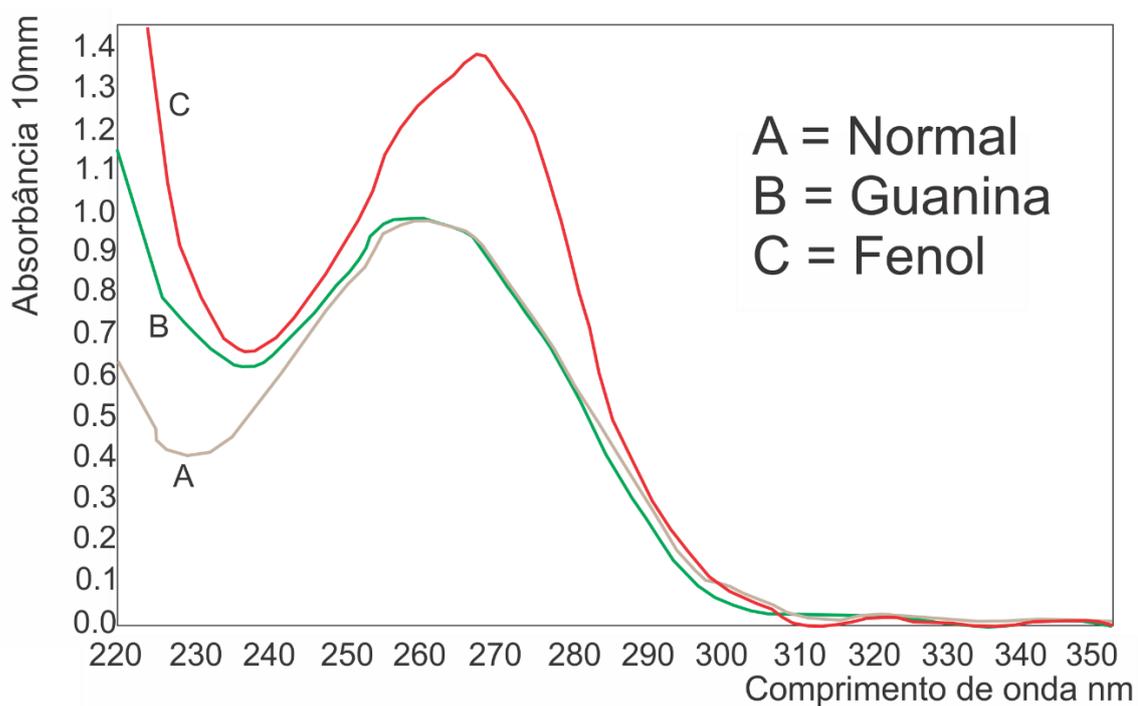
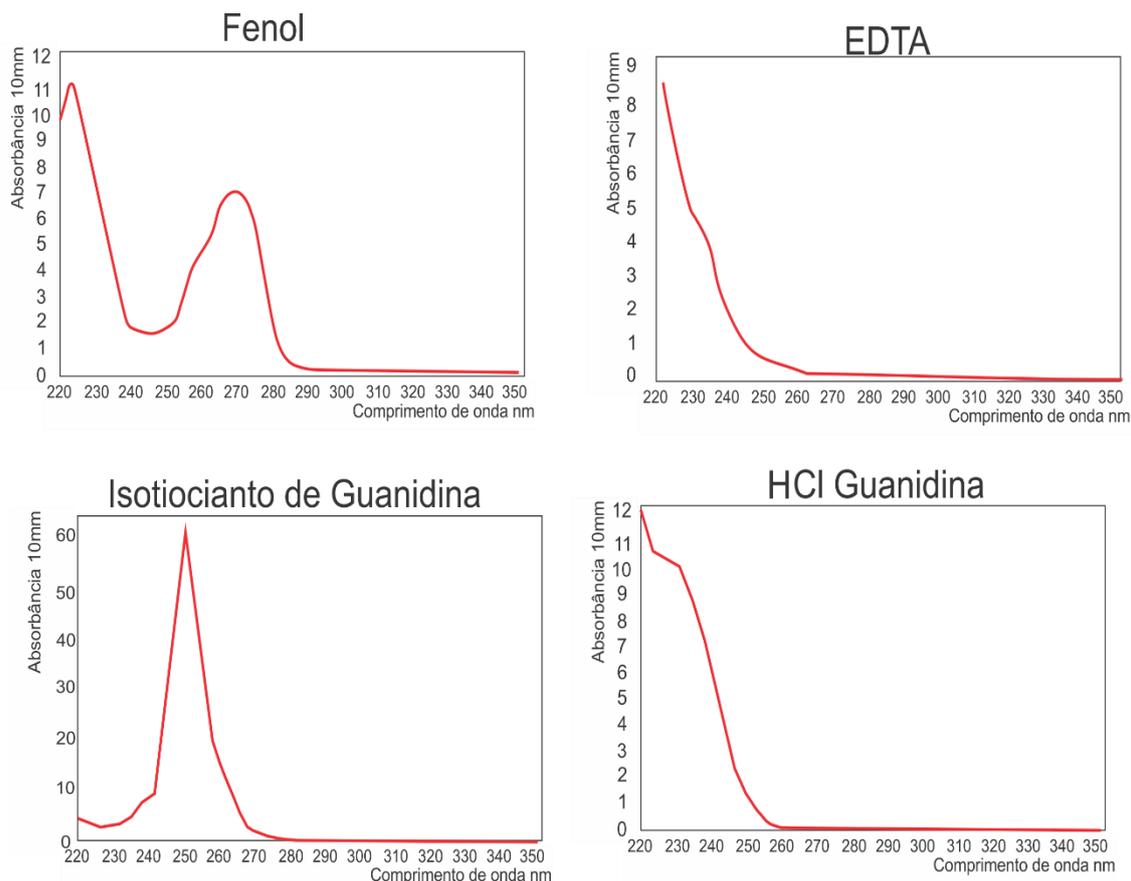


Figura 10. Espectrofotometria de ácido nucleico, comportamento gráfico dos principais contaminantes. Fonte: adaptado de (DATAMED, 2017).



Os espectrofotômetros de microvolume apresentam limites inferiores de detecção entre 0,5 e 2 ng/μl, preconizando que concentrações abaixo de 20 ng/μl possuem baixa confiabilidade das razões de pureza. Portanto, ambas as razões de pureza não são confiáveis quando a concentração de DNA está abaixo de 20 ng/μl, pois são relativamente variáveis (com tendência a apresentar valores altos) em valores de até 50 ng/μl (KOETSIER GIRON, 2019).

4.6 PROCESSAMENTO DE BACTÉRIAS EM CULTURAS

A semeadura adequada é uma das mais importantes e fundamentais etapas para o processo de identificação de uma bactéria em cultura. O objetivo principal da semeadura é isolar e identificar o microrganismo, portanto é necessário manter as condições necessárias para o desenvolvimento desses em um meio cultura, os quais se correlacionam ao seu sítio anatômico, pH, nutrientes e atmosfera (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

Existem diferentes meios de cultura para semeadura das amostras, sendo esses selecionados conforme o material a ser analisado. Amostras estéreis devem ser semeadas em meios nutritivos pois essas não possuem microbiota habitual. Em amostras que são ricas em microbiota, como as fezes, deve-se utilizar meios seletivos que permitem que os prováveis patógenos prevaleçam. A associação de meios pode ser recomendada em alguns casos (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019). Os meios de cultura frequentemente empregados são descritos no

Quadro 1.

A seleção correta dos meios de cultura, a temperatura, a atmosfera e o tempo de incubação são os principais cuidados a serem tomados para o cultivo bacteriano (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

Quadro 1. Meios de cultura mais frequentemente utilizados para o isolamento bacteriano.

Meio	Finalidade	Atmosfera de incubação
AS (ágar sangue)	Meio não seletivo e diferencial que permite o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de permitir a visualização de hemólise	Aerobiose, CO ₂ e anaerobiose
CHOC (ágar-chocolate)	Meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias, especialmente <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>	CO ₂
MC (MacConkey)	Meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de bacilos Gram-negativos, diferenciando as bactérias em lactose positiva e negativa. Inibe bactérias Gram-positivas	Aerobiose/CO ₂
SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Detecta a produção de H ₂ S	Aerobiose
CLED (cystine lactose escrolyte deficiente ágar)	Meio que permite o crescimento de um variado número de bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos. Devido à sua composição deficiente em eletrólitos, há inibição do véu de <i>Proteus</i> spp.	Aerobiose
CROMO (cromo ágar)	Meio cromogênico- disponível para cultura de fezes, urina, cultura de vigilância epidemiológica, cultura de <i>Candida</i> spp. e pesquisa de bactérias resistentes a alguns antibióticos	Aerobiose
Manitol Salgado	Meio que permite o isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> de amostras biológicas como urina, secreções, feridas e exudatos	Aerobiose

Fonte: adaptado de (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS A PARTIR DE TESTES BIOQUÍMICOS E COLORAÇÃO DE GRAM

Os testes bioquímicos nos permitem identificar características únicas de diferentes bactérias, como o tipo de substrato que é utilizado, que tipo de enzima é produzida, qual é o produto do metabolismo e se essa necessita de substâncias especiais para o seu crescimento. Para exemplificar alguns testes bioquímicos podemos citar a utilização de citrato como fonte de carbono para algumas enterobactérias, a degradação da ureia na presença da enzima urease na bactéria ou a produção de gás pela bactéria quando colocada em um meio contendo glicose (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

Em 1884, o médico *Hans Cristian Joaquim Gram* observou que as bactérias adquiriam colorações diferentes quando tratadas com determinados corantes. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, coradas por cristal violeta e não descoradas com álcool-acetona, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, descoradas com álcool-acetona e contra-coradas com fuccicina ou safranina, chamadas de Gram-negativas. Tal método de coloração recebeu o nome de Gram, em homenagem ao seu descobridor. Após descrição do método, inúmeras propostas de modificação foram feitas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

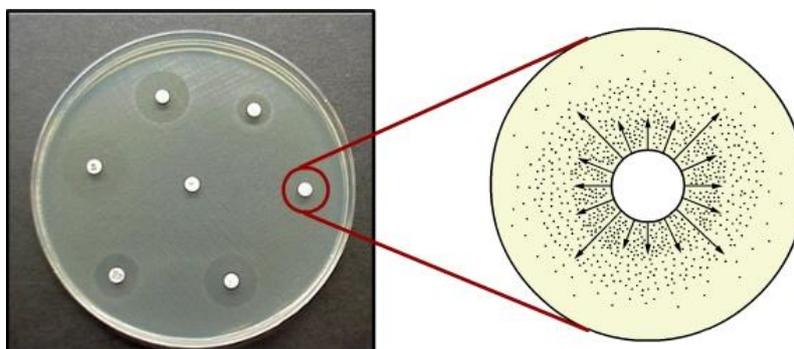
4.8 IDENTIFICAÇÃO DE MRA PELA TÉCNICA DE TSA

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) é um dos testes essenciais na microbiologia clínica, pois avalia a sensibilidade dos microrganismos contra diferentes agentes antimicrobianos. Os resultados destes testes influenciam diretamente na escolha da terapêutica antimicrobiana, e, por

isso, é um teste de extrema importância para a terapêutica adequada do paciente (SEJAS *et al.*, 2003).

O método de disco-difusão foi idealizado por (BAUER *et al.*, 1966). Seu princípio baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC) (**Figura 11**) Considerado um método qualitativo, pois permite classificar a bactéria presente, em sensível (S) ou resistente (R) ao antimicrobiano. O método é considerado prático, de fácil execução e ideal para bactérias de crescimento rápido (SEJAS *et al.*, 2003).

Figura 11. Princípio do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) pela metodologia de disco-difusão. Fonte: (ANVISA, 2008)

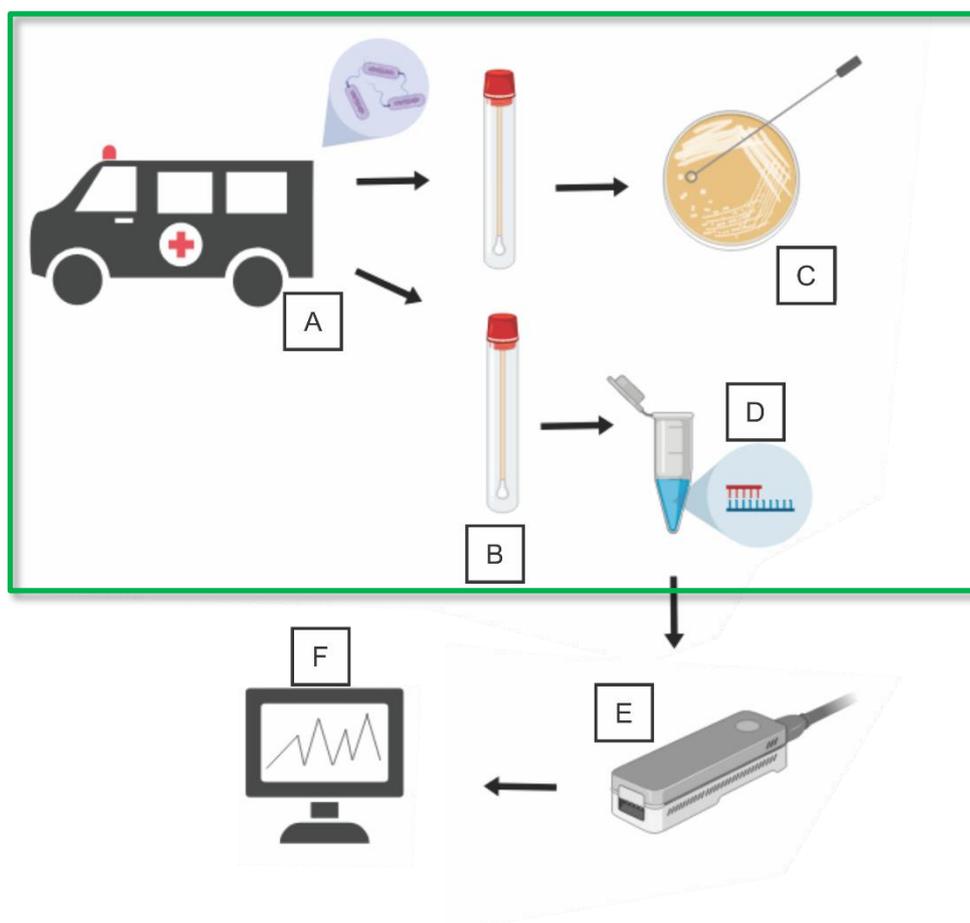


5 METODOLOGIA

Este trabalho integra o projeto de pesquisa intitulado “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”, que tem como objetivo estudar a dinâmica da circulação de MRA, caracterizando comunidades microbianas de fontes-chave: ambiente hospitalar, de criação animal e ambientes que conectam a disseminação microbiana entre esses dois extremos, a pesquisa de MRA será realizada por metagenômica e, alternativamente, pelo isolamento de MRA em cultura.

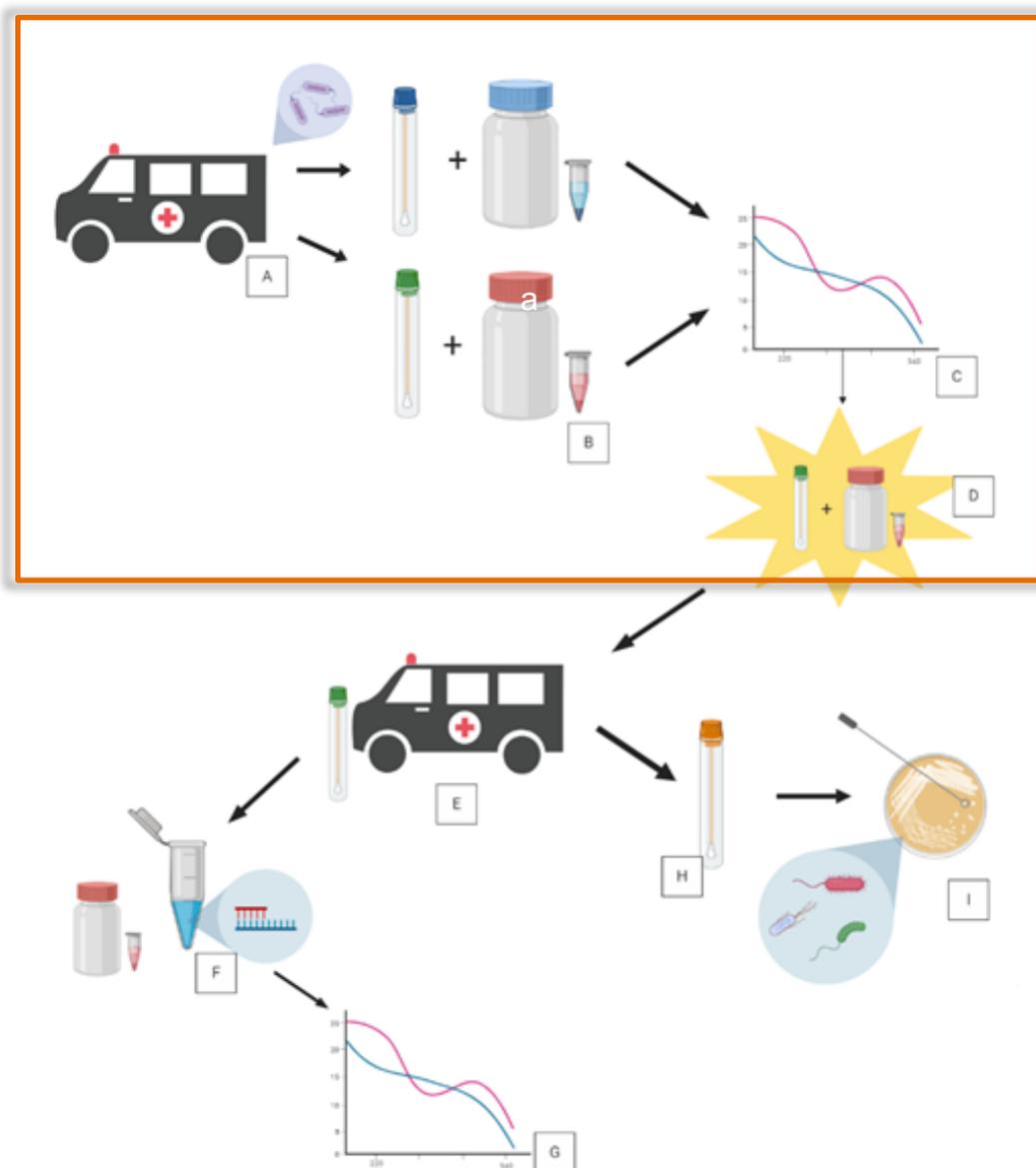
O método de desenvolvimento do referido trabalho pode ser resumido pelo fluxograma da **Figura 12**.

Figura 12 - Fluxograma metodológico do projeto “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”. (A) Transportes de pacientes de cidades do Oeste para Florianópolis; (B) Coleta de *swabs*; (C) Isolamento, identificação e TSA de MRA por cultura; (D) Extração do DNA; (E) Sequenciamento (F) Análise das sequências geradas por Bioinformática. Destacado em verde a parte que é desenvolvida pelo presente trabalho. Fonte: autora.



O desenvolvimento do presente projeto passou por avaliações de métodos de coleta de amostras com *swabs*, determinação do método para o isolamento de MRA, e avaliação do *Kit* de extração de DNA, que são apresentados na metodologia a seguir e discutidos no capítulo de resultados. O fluxograma da **Figura 13** ilustra o método aplicado.

Figura 13. Fluxograma metodológico desenvolvido. (A) Transportes de pacientes de cidades do Oeste para Florianópolis; (B) Seleção dos *swabs* e kits; (C) Comparação dos resultados obtidos; (D) Determinação do *swab* e kit utilizados para a extração do DNA; (E) Realização da coleta com o *swab* determinado; (F) Extração do DNA com o kit determinado; (G) Comparação dos dados obtidos com os testes realizados; (H) Coleta com o *swab* com meio de transporte Amies®, (I) Isolamento, Identificação e TSA dos MRA. Destacado em laranja as etapas de avaliação dos *swabs* de coleta e kits de extração. Fonte: autora.



5.1 ESTRATÉGIA

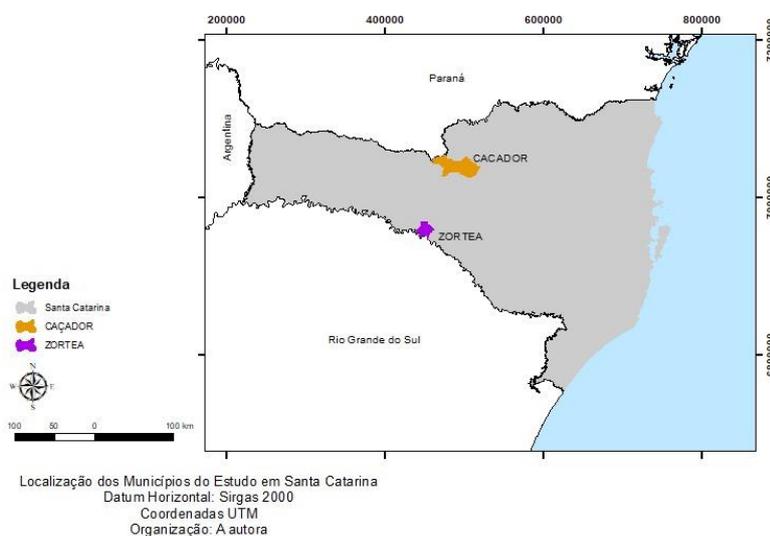
Foram analisadas amostras de *swab* coletadas em transportes municipais, que serviram especificamente aos pacientes e seus familiares para chegarem ao Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU). O total de

coleta foi de dois veículos, os quais foram amostrados em uma campanha de coleta, visando o uso de técnicas não dependentes de cultura celular e outra para técnicas microbiológicas, totalizando quatro amostras.

5.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

O estudo proposto baseia-se na análise de amostras de *swabs* provenientes de veículos de transporte de pacientes vindos do Oeste de Santa Catarina. As coletas foram realizadas dos transportes das cidades de Zortéa e Caçador (**Figura 14**).

Figura 14. Localização dos municípios do estudo. Fonte: autora.



Tais municípios foram selecionados devido suas características de produção agropecuária predominante, portanto, a maioria dos pacientes usuários dos transportes são agricultores e que trabalham diretamente com animais. Esse fato possibilita melhor correlação com os outros dados coletados do projeto principal vinculado.

Foram escolhidos dois tipos de *swabs* para a realização dos testes em coleta de superfície, para que esses fossem utilizados no procedimento de extração de DNA. Os *swabs* testados foram: I) *swab* estéril para coletas da *Labor import*[®], já utilizado pelo Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) (**Figura 15e** II) *swab* flocado da linha SRK (COPAN ITALIA, 2016) (**Figura 16**),

que é específico para a coleta de amostras de superfície. As coletas foram realizadas em momentos distintos.

Figura 15. Swab estéril para coletas da *Labor import*® Fonte: (ORION CIENTIFICO, 2019)



Figura 16. Swab da linha SRK - flocado Copan Italia Fonte: (MEDICAL EXPO, 2019)



Foi padronizada a conduta de coleta com os swabs sobre as superfícies determinadas (volante, encontros e do apoio para entrar no veículo - “holder”), através de dez passagens de cada lado da ponta do swab sobre o local.



Figura 17. Imagens do procedimento de coleta com swabs dos transportes. Fonte: autora.

A partir dos resultados obtidos que são apresentados e discutivos no devido capítulo, foi utilizado um primeiro swab da linha SRK flocado (COPAN ITALIA, 2016) para aplicação de técnicas não dependentes de cultivo celular. Um segundo swab com o meio de transporte Amies (COPAN ITALIA, 2016)

obtido para aplicação das técnicas microbiológicas dependentes do cultivo. Previamente à coleta, ambos os *swabs* foram umedecidos com soro fisiológico estéril (ampolas individuais).

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para o processo de extração de DNA foram testados e analisados dois kits. O kit ReliaPrep™ gDNA *Tissue Miniprep System* da Promega® e o ZymoBiomics™ DNA miniprep kit. Os dois protocolos foram realizados com as amostras coletadas da superfície dos transportes de pacientes em momentos distintos, utilizando-se *swabs* específicos em cada um desses.

O kit ReliaPrep™ gDNA *Tissue Miniprep System* da Promega® (**Figura 18**) foi escolhido para o teste pois é um protocolo já utilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório MIMA e sendo esse nunca testado para amostras de superfície, somente para isolados bacterianos.

Figura 18. kit ReliaPrep™ gDNA *Tissue Miniprep System* da Promega®. Fonte: (FISHER SCIENTIFIC, 2019)



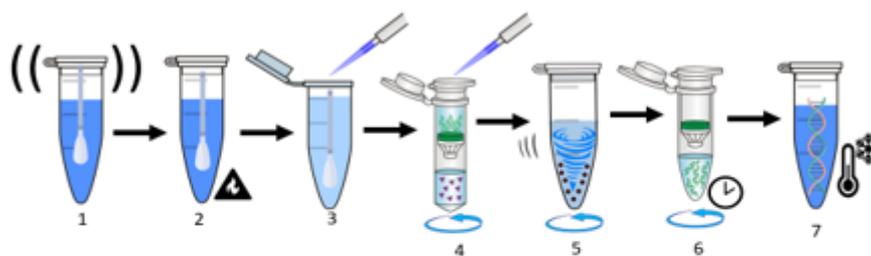
O protocolo determinado pelo fabricante é composto por diferentes passos para a obtenção do DNA. Iniciando pela preparação das amostras através da utilização PBS, proteinase K (PK) e *buffer* de lise celular (*Cell Lysis Buffer*- CLD). O Segundo passo é a ligação do DNA à coluna em que se utiliza um tampão de ligação (*Binding Buffer* – BBA) em uma coluna (*Relia Prep™ Binding Column*) acoplada a um tubo (collection tube). O terceiro passo é de lavagem, em que se utiliza uma solução de lavagem (*Wash Solution* – CWD) em

3 ciclos de lavagem da amostra. E por último, o passo de eluição da amostra, através da utilização de água livre de nucleases (*Nuclease-Free Water*) e assim, obtendo o DNA desejado.

O procedimento utilizado é descrito a seguir e resumido pela **Figura 19**:

1. Colocar o *swab* em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionar 400 μ L de PBS;
2. Adicionar 20 μ L de Proteinase K (PK) e vortexar;
3. Adicionar 400 μ L *Cell Lysis Buffer* (CLD) e vortexar por 10 segundos;
4. Incubar até 56°C por 30 minutos;
5. Retirar do aquecimento e adicionar 500 μ L de *Binding Buffer* (BBA) e vortexar por 10 segundos;
6. Preparar o tubo do kit com a coluna ReliaPrep™ *Binding*;
7. Adicionar o líquido à coluna (volume proporcional ao seu tamanho). Centrifugar por 1 minuto em rotação máxima. Descartar o *swab*;
8. Adicionar 500 μ l da solução *wash column* (CWD) e centrifugar por 2 minutos em rotação máxima. Se a amostra ainda estiver visível no topo da membrana, centrifugar a coluna por mais um minuto.
9. Repetir o passo 8 duas vezes, até um total de 3 lavagens;
10. Eluir as amostras duas vezes, com 50 μ L de *Nuclease-Free Water* aquecida a 56°C e deixar por 5 minutos. Em seguida, centrifugar por 1 minuto em rotação máxima.
11. Realizar a dosagem de cada eluição para avaliar a concentração de DNA obtida e caso necessário alterar o volume de eluição para proceder com o sequenciamento;
12. Descartar a coluna. O DNA genômico pode ser colocado a 4 ° C para armazenamento de curto prazo ou -20 ° C para armazenamento a longo prazo.

Figura 19. Resumo do protocolo do kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System/Promega®.
Fonte: autora.



- 1) Adição de PBS; PK e CLD – vortex;
- 2) Aquecimento em banho maria 56°C por 30 minutos;
- 3) Adição de BBA- vortex;
- 4) Preenchimento da coluna e centrifugação;
- 5) Lavagem e centrifugação;
- 6) Eluição;
- 7) Descarte de coluna e armazenamento.

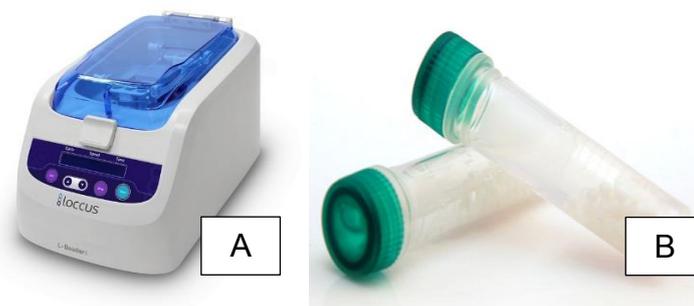
O kit Zymo BIOMICS™ DNA Miniprep Kit® foi selecionado devido pesquisas realizadas, as quais sugerem um melhor desempenho no processo de extração do DNA (**Figura 20**).

Figura 20. Zymo BIOMICS™ DNA Miniprep Kit®. Fonte:(ZYMO RESEARCH, 2019a)



O kit é composto por mais etapas em relação ao outro mencionado, pois apresenta diferentes colunas e filtros para a obtenção de uma amostra mais pura possível. O grande diferencial desse kit é que seu processo inicial propõe a lise da amostra através da utilização de *beads* que sofrerão agitação com auxílio do aparelho bead better Loccus® (**Figura 21**)

Figura 21. A) Bead better Loccus® B) Tubo de lise com *beads* Fonte: (LOCCUS, 2019) (ZYMO RESEARCH, 2019b)

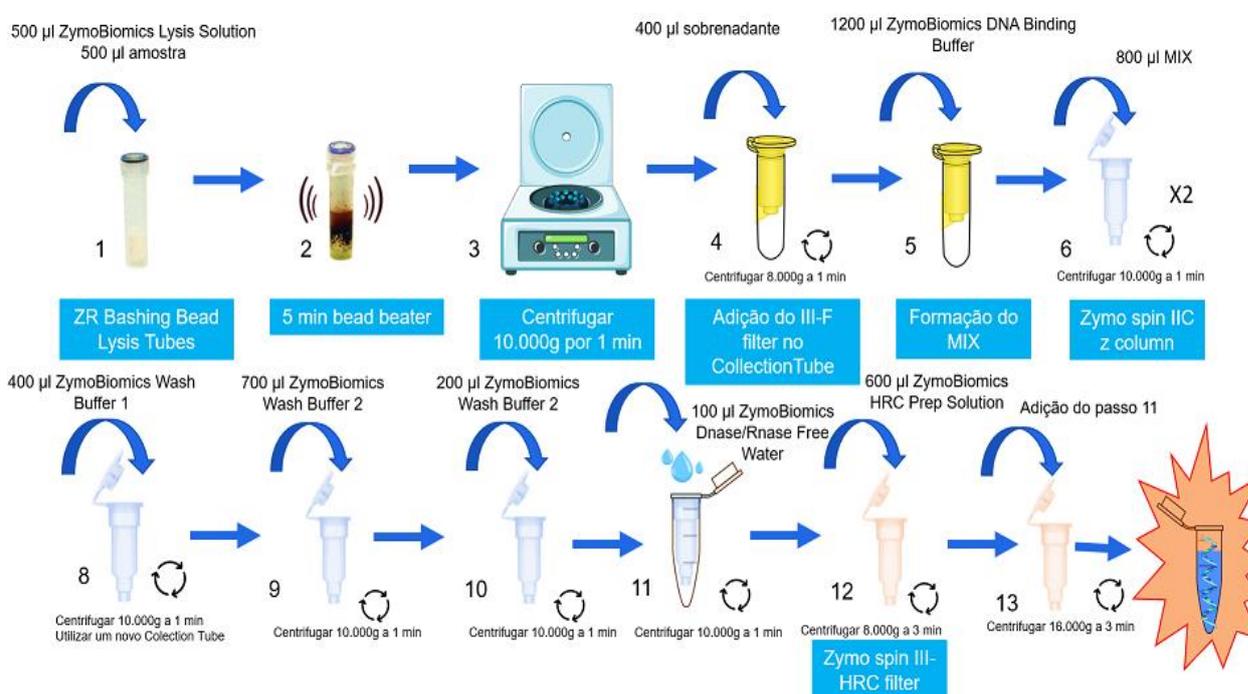


O seu procedimento é descrito a seguir e resumido pela **Figura 22**:

1. Colocar o swab coletado no tubo de lise (Lysis Tube);
2. Adicionar 500 μ l de Zymo Biomics *Lysis Solution* e 500 μ l de DNA Shield;
3. Agitar por 5 min no Bead better Loccus®;
4. Centrifugar por 1 min a 10.000 xg;
5. Transferir 400 μ l do sobrenadante para o Zymo Spin™ III-F Filter em um *collection tube* e centrifugar por 1 min a 8.000 xg e em seguida descartar o Zymo Spin™ III-F Filter;
6. Adicionar 1.200 μ l de *DNA Binding Buffer* no filtrado obtido no passo 5. Homogeneizar bem;
7. Transferir 800 μ l da mistura obtida no passo 6 para a Zymo-Spin IIC-Z Column em um *collection tube* e centrifugar por 1 min a 10.000g;
8. Descartar a solução que ficou presente no *collection tube* e repetir o passo 7;
9. Adicionar 400 μ l do DNA Wash Buffer 1 na Zymo-Spin IIC-Z Column em um novo *collection tube* e centrifugar por 1 min a 10.000g. Descartar a solução que ficou presente no *collection tube*;
10. Adicionar 700 μ l do DNA Wash Buffer 2 na Zymo-Spin IIC-Z Column e centrifugar por 1 min a 10.000 xg. Descartar a solução que ficou presente no *collection tube*;
11. Adicionar 200 μ l do DNA Wash Buffer 2 na Zymo-Spin IIC-Z Column por 1 min;

12. Transferir a Zymo-Spin IIC-Z Column para um microtubo de 1,5 ml e adicionar 100 µl de DNase/ RNase Free Water diretamente na coluna e deixar incubar por 1 min;
13. Colocar o Zymo- Spin TM III-HRC Filter em um novo collection tube e adicionar 600 µl de HRC Prep Solution. Centrifugar por 3 min a 8.000 xg;
14. Adicionar o filtro preparado no passo 13 em um microtubo de 1,5 ml e transferir o DNA eluido no passo 12 sobre o filtro. Centrifugar por 3 min a 16.000 xg.

Figura 22. Resumo do protocolo da Zymo BIOMICS TM DNA Miniprep Kit[®]. Fonte: autora.



5.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DE PUREZA

O DNA obtido foi quantificado e sua pureza analisada através da utilização do equipamento *Nanovue Plus TM Spectrophotometer*. Foram utilizados 2µl da amostra e 2 µl do eluente presente no kit de extração para zerar o aparelho utilizado como branco.

5.5 ISOLAMENTO DE MRA E CONSTRUÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO

A construção de biorrepositórios é descrito por (MARODIN *et al.*, 2013) através da apresentação de protocolos brasileiros, desenvolvidos em 2009, pelo Ministério da Saúde do Brasil e o Departamento de Ciência e Tecnologia, por meio da Coordenação de Ética em Pesquisa e Bioética, para a regulamentação do armazenamento e uso de material biológico humano em pesquisas, observando a necessidade de estabelecer e operar biobancos no país.

O biorrepositório apresenta como objetivo a manutenção do material coletado para a possibilidade de utilização em pesquisas futuras, sendo sempre necessária a apresentação de tais potenciais pesquisas futuras ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Esses isolados foram coletados e armazenados ao longo da execução do trabalho, sob responsabilidade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do HU e sob gerência dos pesquisadores, sendo que também serão depositados no biorrepositório da Fiocruz, Rio de Janeiro, e cadastrados no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado). O procedimento da formação do biorrepositório é apresentada como método e discutido no capítulo de resultados.

5.6 IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS

As colônias obtidas foram identificadas de forma presuntiva, a partir de testes bioquímicos convencionais como descritos por (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019) e (ANVISA, 2013). Para identificação de bactérias Gram positivas o método é descrito na **Figura 23** e, para a identificação de bactérias Gram negativas o método é descrito na **Figura 24**. Essa metodologia foi utilizada para auxiliar no processo de identificação a partir da metodologia MALDI-TOF.

Figura 23. Fluxograma simplificado para identificação de cocos Gram Positivos. Fonte: autora.

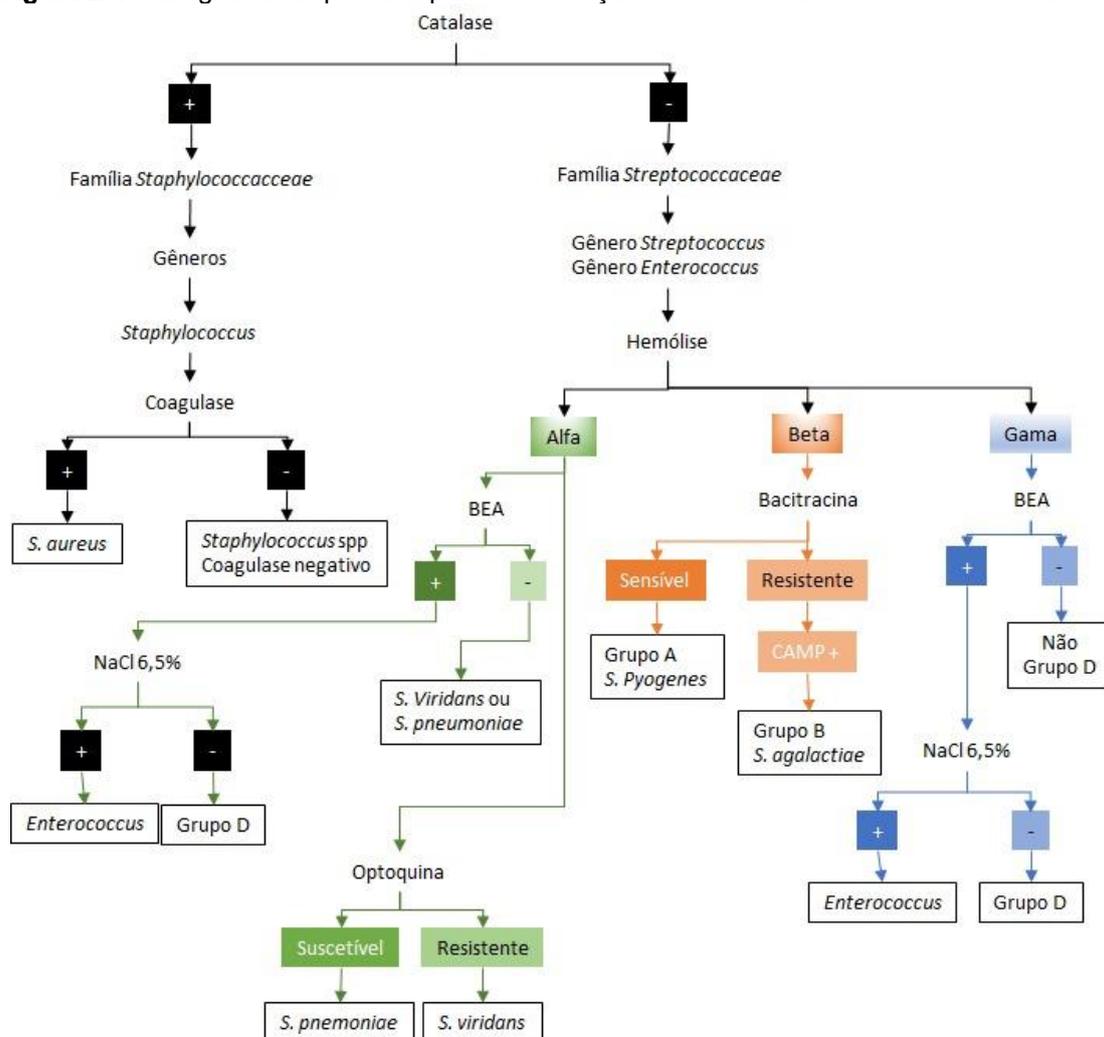
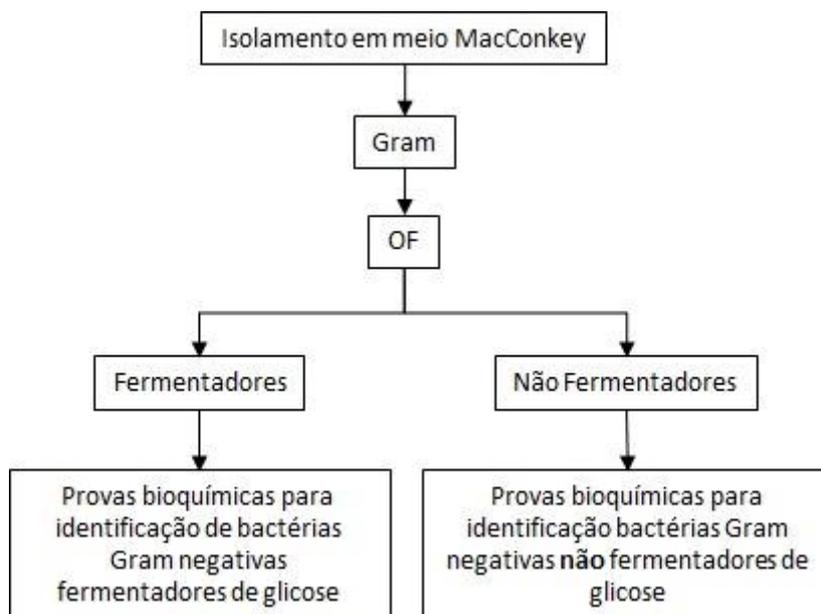


Figura 24 – Fluxograma simplificado para identificação de bacilos Gram Negativo. Fonte: autora.

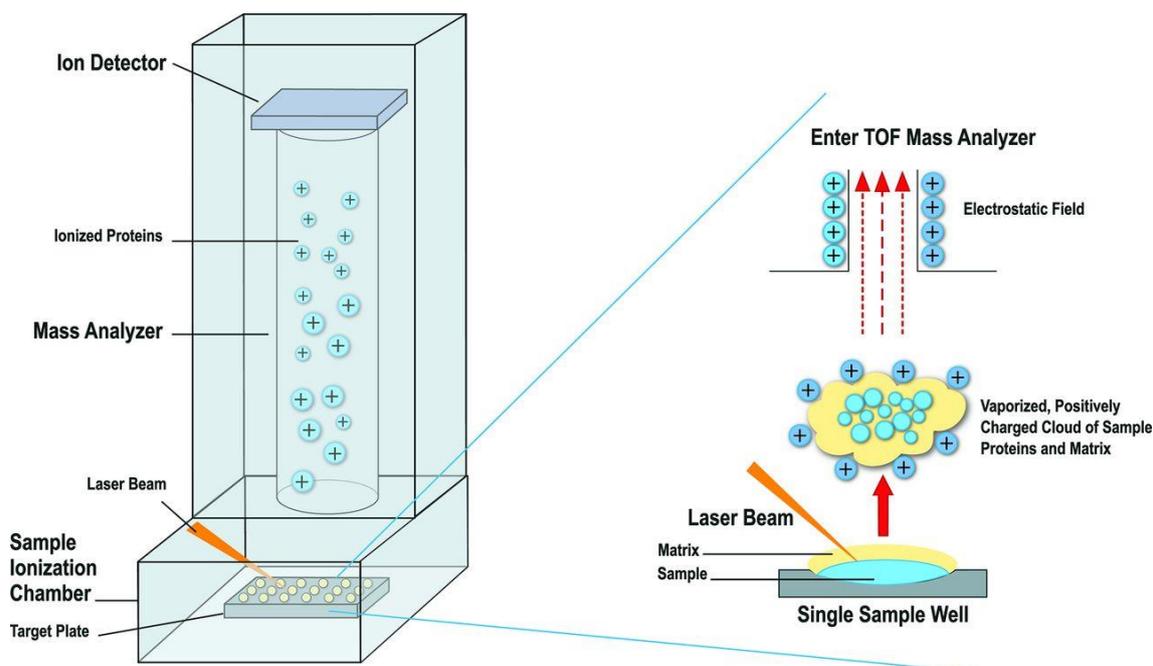


5.7 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA MALDI-TOF

Para uma identificação mais precisa dos microrganismos presentes em cada amostra, utilizou-se a metodologia MALDI-TOF, com a colaboração do Laboratório Municipal de Curitiba.

O aparelho VITEK[®]MS bioMérieux Brasil utiliza espectrometria de massa para avaliar o perfil proteico da amostra, permitindo a identificação baseada em um banco de dados de perfis conhecidos. A análise consiste na colocação do material biológico (colônias) em uma placa que apresenta uma matriz polimérica, a qual é irradiada por um laser que vaporiza a amostra e promove a ionização em várias moléculas, as quais são levadas a um detector através de um tubo a vácuo, gerando um perfil proteico. A identificação é realizada conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*), o que é possível visualizar por gráficos, que apresentam diferentes picos e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado da identificação. Tal metodologia atua com rapidez e exatidão, sendo ilustrada pela **Figura 25** (PASTERNAK, 2012).

Figura 25. Ilustração da metodologia MALDI-TOF. Fonte: (ASTA, 2019)



5.8 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

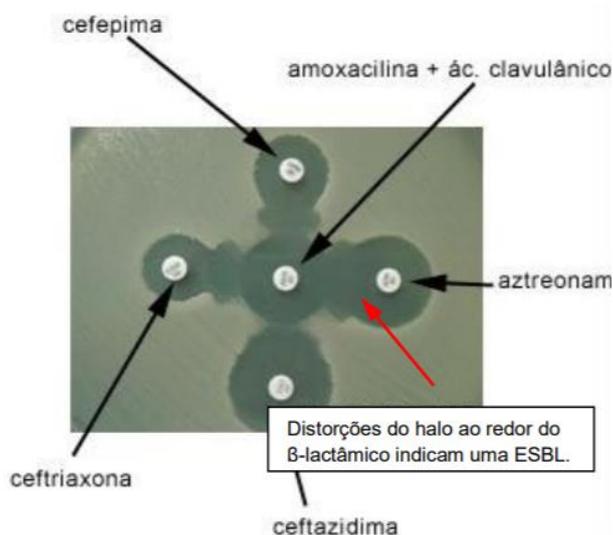
O TSA foi realizado para apenas 17 bactérias identificadas de acordo com o preconizado pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCast (www.brcast.org.br). A partir de uma suspensão de acordo com a turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml), 51 placas (2 placas de 150mm de diâmetro e 1 placa de 100mm de diâmetro para cada bactéria) com ágar Muller Hinton foram inoculadas com auxílio de um *swab* de algodão estéril. De acordo com a espécie identificada, os seguintes discos de antimicrobianos foram aplicados nas placas: Cefotaxima 5µg; Cefepima 30µg; Imipenem 10µg; Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg; Ampicilina + Sulbactam 10/10µg; Meropenem 10µg; Ertapenem 10µg; Cefuroxima 30µg; Cefalexina 30µg; Piperacilina + tazobactam 30/6µg; Cefoxitina 30µg; Aztreonam 30µg; Eritromicina 15µg; Clindamicina 2µg; Tigeciclina 15µg; Ácido Nalidíxico 30µg; Amicacina 30µg; Gentamicina 10µg; Fosfomicina 200µg; Nitrofurantoina 100µg; Ceftazidima 10µg; Levofloxacina 5µg; Ciprofloxacina 5µg; Ampicilina 10 µg; Tobramicina 10µg; Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg; Ceftriaxona 30µg e Vancomicina 5µg.

Os discos de antimicrobianos foram dispostos de forma a identificar não somente a resistência presente em cada disco, mas também outros possíveis mecanismo de resistência, como a resistência induzível à clindamicina, através do achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina, fenótipo MLS_B positivo (**Figura 26**) e produção de ESBL através do processo de sinergismo (“Ghost- Zone”) através da aproximação dos discos de Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg e Cefalosporinas de terceira geração (**Figura 27**)

Figura 26. “Teste D”. Fenótipo MLS_B positivo Fonte: (MONTROYA C *et al.*, 2009)



Figura 27. Teste de aproximação de discos. ESBL positiva Fonte: (SCHERER, 2012)



Todas as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 16 a 20 horas (ou conforme indicação) e posteriormente os halos de cada antimicrobiano foram analisados através da tabela de pontos de corte clínicos do BrCAST.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DA COLETA DE SWABS E EXTRAÇÃO DE DNA

Para a avaliar os procedimentos de coleta de amostras e extração de DNA, foram realizados testes com dois diferentes *swabs* e dois diferentes kits de extração de DNA genômico. Como **Protocolo 1** se utilizou o *swab* estéril para coletas da *Labor import*[®] com a utilização do kit ReliaPrep[™] gDNA Tissue Miniprep System da Promega[®]. E como **Protocolo 2** se utilizou o *swab* da linha SRK flocado da Copan Italia[®] com o kit de extração ZymoBIOMICS[™] DNA Miniprep Kit. Totalizando 6 amostras, 3 para cada kit realizado.

Após a obtenção do DNA das amostras, o mesmo foi quantificado a 260nm e avaliado quanto à pureza (relações de A260/280 e A260/230) utilizando o equipamento *Nanovue Plus[™] Spectrophotometer*. Todas as amostras obtidas foram aplicadas (5 µl) em gel de agarose 0,8%, porém como a quantidade de DNA total se apresentou muito baixa, não foi possível a observação das bandas.

Primeiramente, é possível analisar a concentração de DNA obtida em cada amostra do Protocolo 2, o qual se apresentou superior, em relação às obtidas com o Protocolo 1. Resultado que demonstra um maior rendimento na obtenção do DNA através da utilização do *swab* da linha SRK flocado da Copan Italia[®] com o kit de extração ZymoBIOMICS[™] DNA Miniprep Kit, tais dados são descritos na **Tabela 1**.

Tal resultado de rendimento da concentração final do DNA obtido com o Protocolo 2, pode ser justificado primeiramente pela utilização de um *swab* com material flocado específico para superfícies de contato (mais absorvente e que desprende maior quantidade de material). Um segundo ponto, é que a partir da análise do ZymoBIOMICS[™] DNA Miniprep Kit é possível propor que a utilização de diferentes filtros e colunas torna o DNA obtido mais puro e, pela presença no processo inicial de tubos contendo *beads* que sofreram agitação por 5 minutos, o que auxiliou na lise de todo o material presente no *swab*. E no último passo do kit, em que é sugerida a preparação de um filtro, o qual segundo o fabricante apresenta removedores de inibidores de PCR, que garante o não transporte de tampões, sais ou outros inibidores, assim, o DNA está pronto para outras aplicações.

A partir dos dados obtidos da quantificação, foram plotados gráficos (**Figura 28 a Figura 30**), que demonstram os possíveis erros e interferentes presentes nessas amostras, assim, auxiliando na conduta de escolha do *swab* e avaliação dos kits testados.

Também foram avaliados os valores obtidos nas relações A260/280 e A260/230. A partir disso, os valores encontrados nas duas coletas não podem ser considerados reais devido às concentrações inferiores a 20 ng/μl, tornando essas relações relativamente variáveis, como é descrito por (KOETSIER GIRON, 2019). Os valores encontrados são descritos na **Tabela 1**.

Os gráficos obtidos com o Protocolo 1 (**Figura 28 a Figura 30**) apresentam um comportamento característico da presença de contaminantes, os quais interferem na pureza da amostra. Valores ideais estão ilustrados nas **Figura 9 e Figura 10**.

Já os gráficos obtidos no Protocolo 2 (**Figura 28 a Figura 30**) apresentam um comportamento desejado para uma amostra de DNA extraído. Mesmo que não tenha sido possível analisar as relações A260/280 e A260/230, seus gráficos apresentam um perfil desejado, como ilustrado na **Figura 8**.

Tabela 1. Valores de absorvância do DNA obtido com os protocolos 1 e 2.

	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Swab Labor import® + kit Relia Prep™			Swab SRK flocado Copan® + kit ZymoBIOMICS™		
	Holder	Volante	Encosto	Holder	Volante	Encosto
Concentração (ng/μL)	10,2	5,4	6,9	15,9	17,5	6,9
A230	0,98	0,42	0,96	-0,189	0,51	-0,045
A260	0,92	0,34	0,86	0,023	0,66	0,109
A280	0,84	0,291	0,8	0,042	0,58	0,048
A320	0,72	0,231	0,72	0,095	0,307	-0,22
A260/280	1,632	1,783	1,671	1,257	1,282	1,228
A260/230	0,776	0,569	0,459	3	1,707	1,88

Fonte: autora.

Figura 28. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do “Holder” dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho). Fonte: autora.

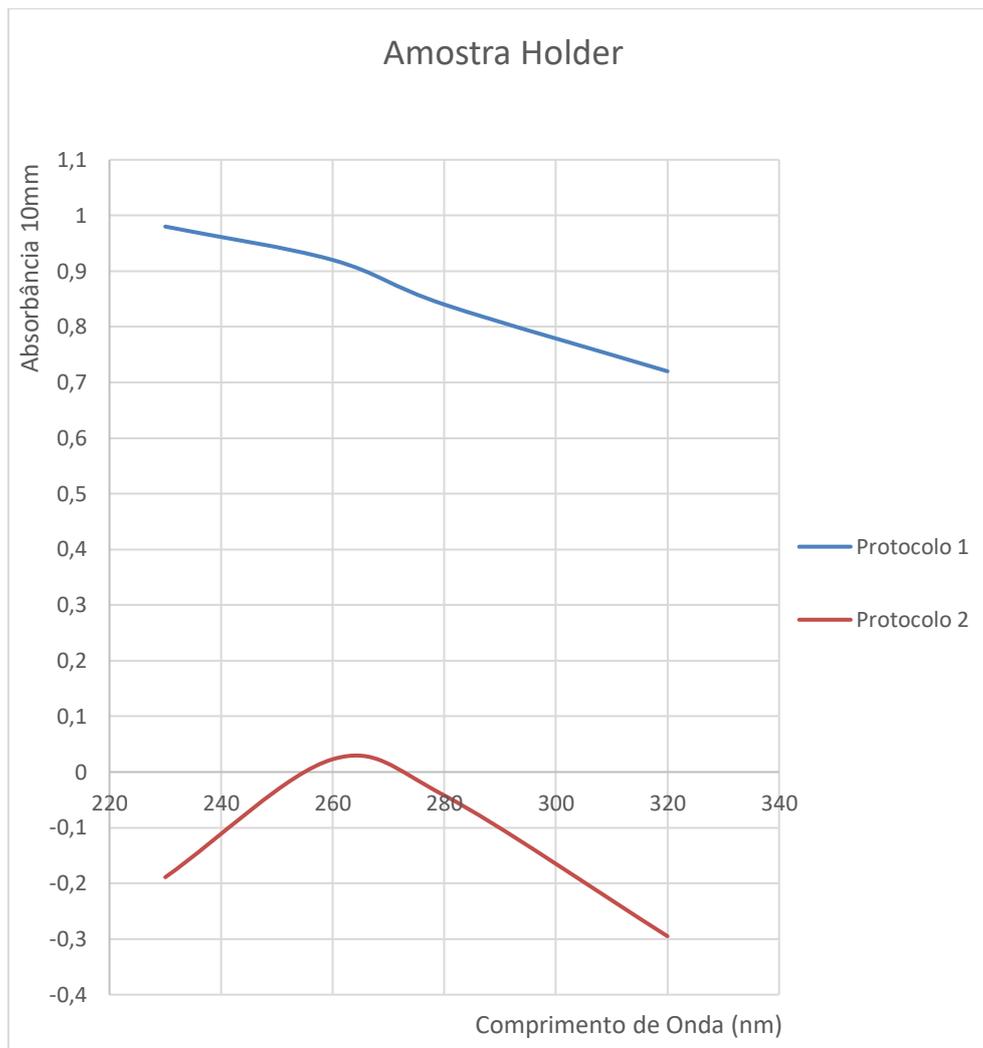


Figura 29. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do encosto dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho). Fonte: autora.

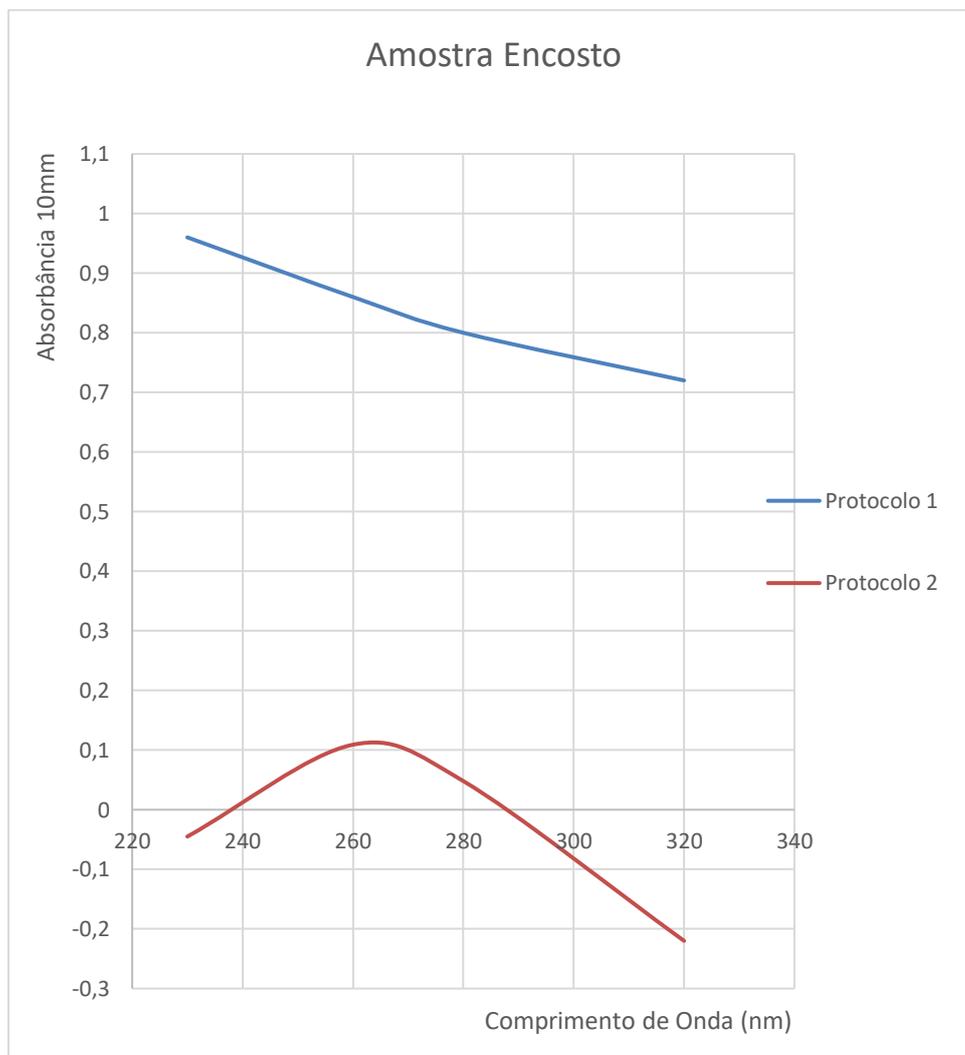
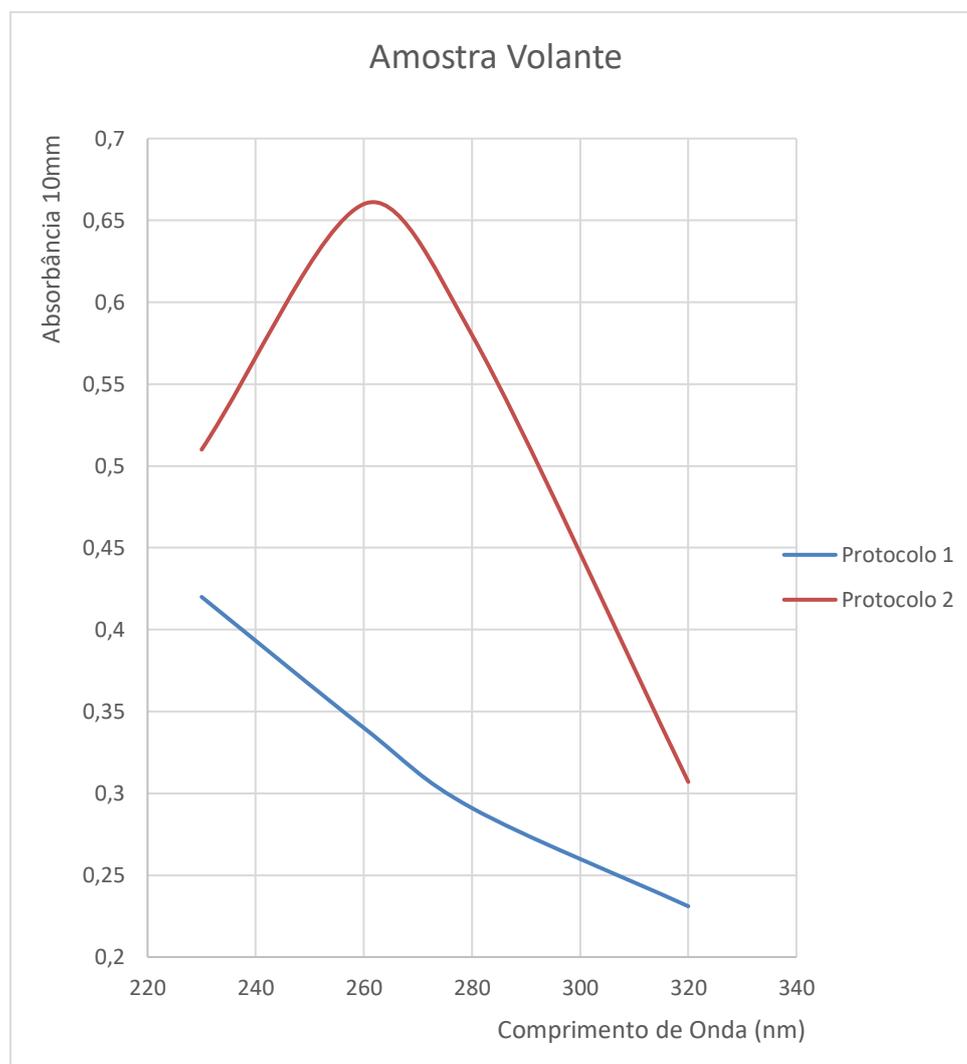


Figura 30. Representação gráfica das absorbâncias obtidas com o DNA extraído do volante dos veículos pelos Protocolos 1 (azul) e 2 (vermelho). Fonte: autora.



A partir desses resultados foi selecionado o *swab* da linha *SRK* flocado da Copan Italia® para a coleta de amostras de superfície nos transportes de pacientes e o kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit para a extração do DNA total das amostras do projeto “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”.

6.2 COLETA DOS TRANSPORTES PARA APLICAÇÃO DO PROTOCOLO 2

Foram coletadas as amostras com os *swabs* da linha *SRK* flocado da Copan Italia® das superfícies dos transportes das cidades de Zortéa e Caçador, totalizando 6 amostras. Todas as amostras sofreram o processo de extração de DNA utilizando o ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit, porém optou-se por realizar dois ciclos de lise de 2,5 minutos intercalados por dois ciclos de 1 minuto em banho de gelo no processo de agitação das amostras com o aparelho bead better Loccus®, para evitar aquecimento do material.

As amostras foram eluidas em um volume total de 50 µl e foram concentradas no aparelho Speed Vac™ Concentrator e, rediluídas para um volume de 15 µl. Tal medida foi adotada, para obtenção de maior concentração do DNA total dessas amostras.

Em seguida, as mesmas foram quantificadas no aparelho *Nanovue Plus™ Spectrophotometer*, conforme **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de absorbância das cidades de Zortéa e Caçador. Fonte: autora.

	Zortéa			Caçador		
	Holder	Volante	Encosto	Holder	Volante	Encosto
Concentração (ng/µL)	10,9	17	7,3	16,5	14	9,2
A230	1,35	3,24	0,74	1,91	1,9	1,08
A260	0,228	2,28	0,184	1,18	0,87	0,258
A280	0,096	2,12	0,099	1,02	0,71	0,14
A320	0,01	1,94	0,039	0,85	0,59	0,075
A260/280	2,535	1,943	2,417	1,953	2,284	2,815
A260/230	0,163	0,262	0,207	0,311	0,213	0,183

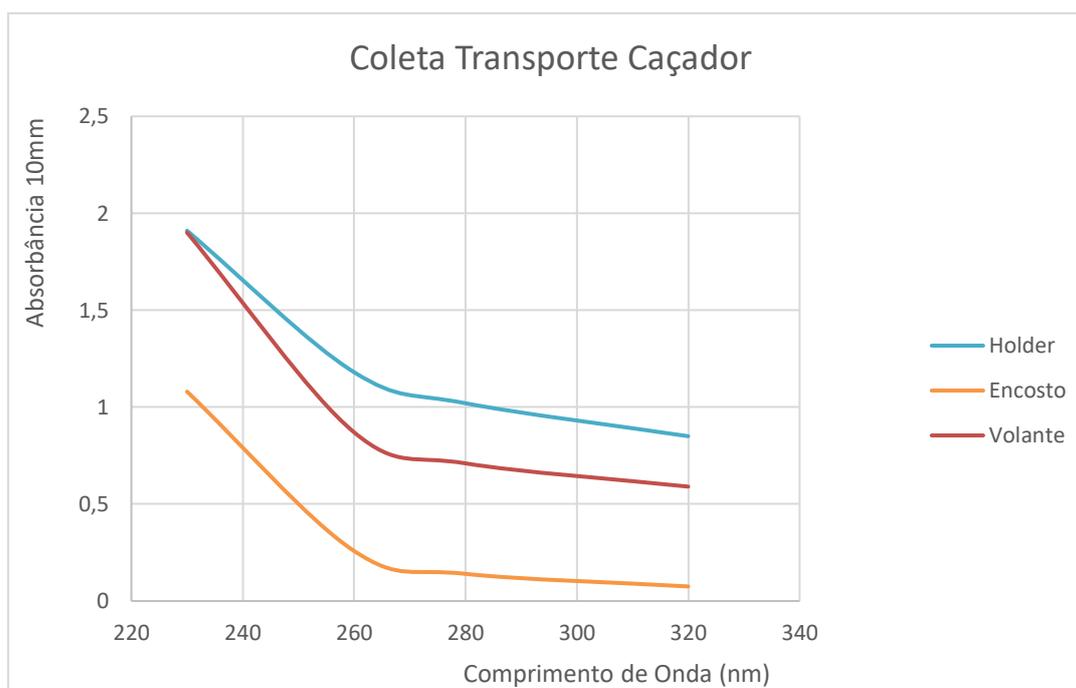
Fonte: autora.

A partir dos dados apresentados, foram plotados gráficos (**Figura 31** e **Figura 32**) que auxiliam na análise das amostras obtidas. Já que as mesmas apresentaram valores de concentração inferiores as 20 ng/µl e assim os resultados de A260/280 e A260/230 não são confiáveis.

Figura 31. Representação gráfica das absorvâncias obtidas na coleta do transporte da cidade de Zortéa. Fonte: autora.



Figura 32. Representação gráfica das absorvâncias obtidas na coleta do transporte da cidade de Caçador. Fonte: autora.



Os presentes gráficos obtiveram a mesma conformação, sugerindo uma semelhança de absorvância em todas as amostras. Porém, a conformação apresentada indica a presença de contaminantes nas amostras obtidas.

As variações obtidas nas diferentes coletas utilizando o Protocolo 2 podem ser devido às variações da carga celular e microbiana dos sítios de coleta, e o impacto dessas variações serão analisadas posteriormente no sequenciamento de DNA das amostras.

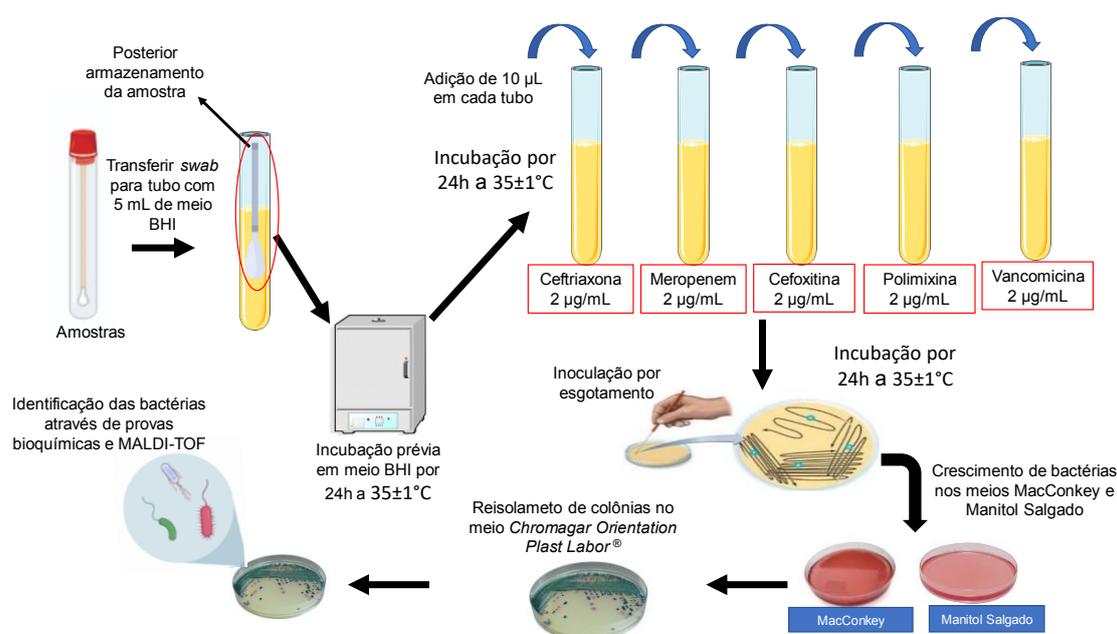
6.3 ISOLAMENTO DE MRA E FORMAÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO

O biorrepositório foi construído a partir da coleta com o *swab* com o meio de transporte Amies (COPAN ITALIA, 2016) das superfícies das regiões dos veículos das cidades de Caçador e Zortéa (volante; assentos e apoio para entrar no veículo - “*holder*”), totalizando dois *pool* de amostras. Tais *swabs* foram transferidos para um tubo com 5 mL de meio BHI, para enriquecimento do meio e posteriormente tais *swabs* foram congelados para armazenamento. Os meios BHI enriquecidos de amostra foram incubados por 24h em 35±1°C. Em seguida, foram transferidos 10 µL dessa amostra enriquecida para novos tubos com 2 mL de meio BHI, enriquecido com antimicrobianos selecionados, que foram: **ceftriaxona 2 µg/mL**, cefalosporina de terceira geração utilizada para a triagem de bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL); **meropenem 2 µg/mL**, para a triagem de bactérias produtoras de carbapenemases; **cefoxitina 2 µg/mL**, cefalosporina de segunda geração para a triagem de MRSA; **polimixina 2 µg/mL** para triagem de bactérias resistentes às polimixinas, e **vancomicina 2 µg/mL** para a triagem de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). Os tubos foram incubados por 24h a 35±1°C , totalizando dez amostras.

As amostras obtidas foram inoculadas por esgotamento em ágar Manitol salgado, para isolamento de *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* que também são resistentes a altas concentrações de NaCl e o ágar MacConkey, para a confirmação da presença de bactérias Gram negativas (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Após o crescimento nas placas foi realizado o reisolamento das colônias obtidas em distintas placas de *Chromagar Orientation PlastLabor*® incubadas por 24h a 35±1°C , tal meio possibilita uma identificação presuntiva dos microrganismos de acordo com a coloração que este apresenta no meio semeado (*E. coli*: Vermelho;

Enterococcus: Azul turquesa; *Proteus*: Marrom; *Klebsiella*, *Entobacter*: Azul metálico; *S. saprophyticus*: rosa, opaco e pequeno; *Citrobacter*: Azul metálico com halo vermelho e *S. aureus*: dourado ou ouro opaco pequeno), conforme **Figura 34** e **Figura 36**. Em seguida, é realizado o processo de identificação apenas das bactérias de interesse clínico, através de provas bioquímicas. Todas as colônias isoladas foram armazenadas à -20°C em meio BHI com glicerol 20%. A metodologia descrita é ilustrada pela **Figura 33**.

Figura 33. Metodologia para formação do biorrepositório. Fonte: autora.



Coleta do transporte da Cidade de Zortéa:

Figura 34. Isolamento em meios Manitol salgado e MacConkey das amostras do transporte de Zortéa. Fonte: autora.

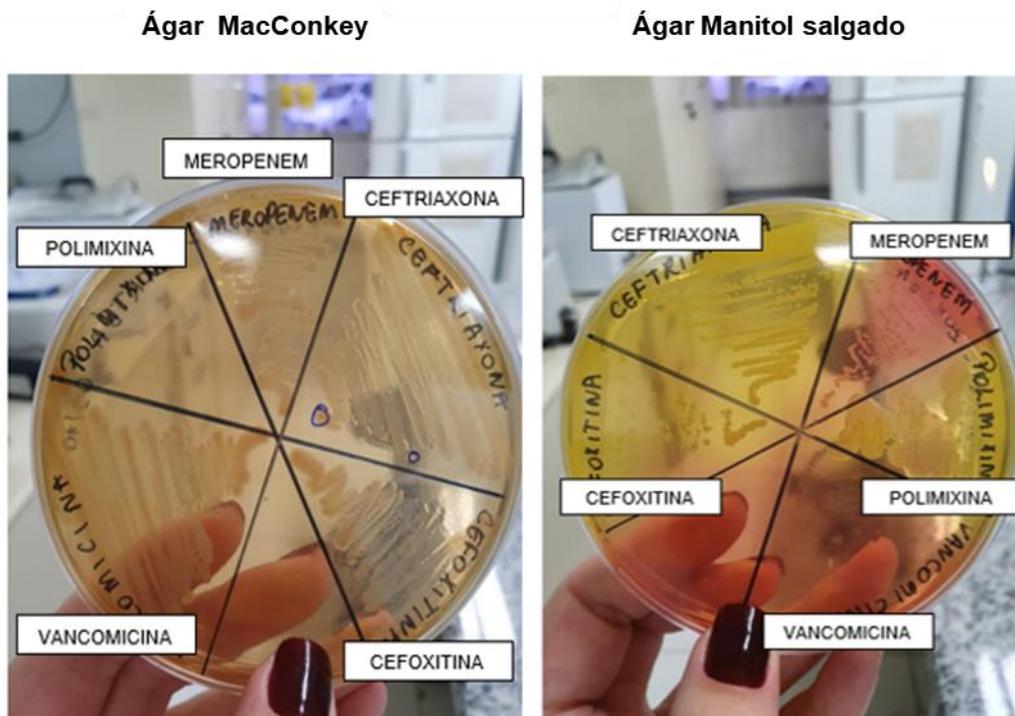
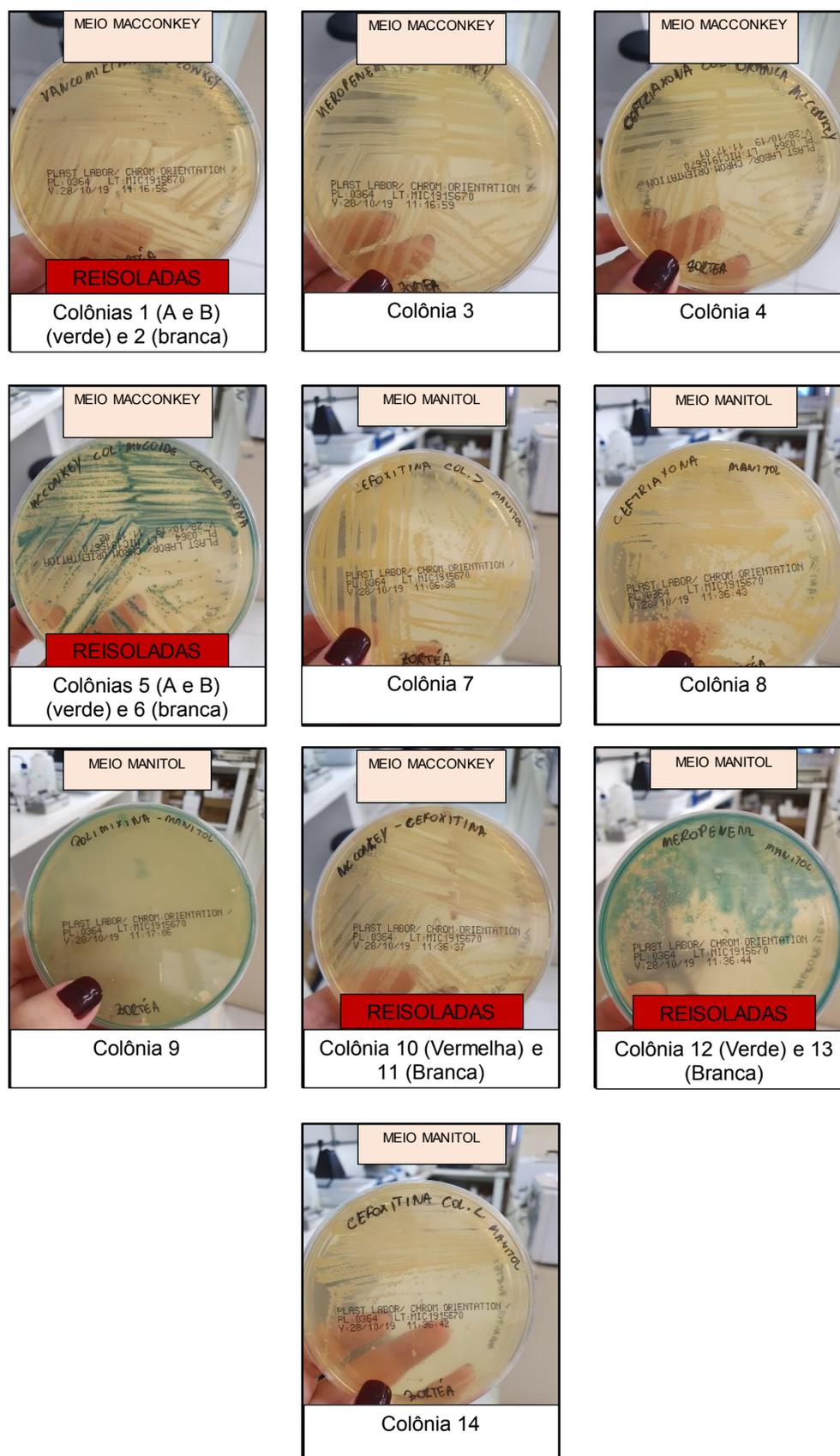


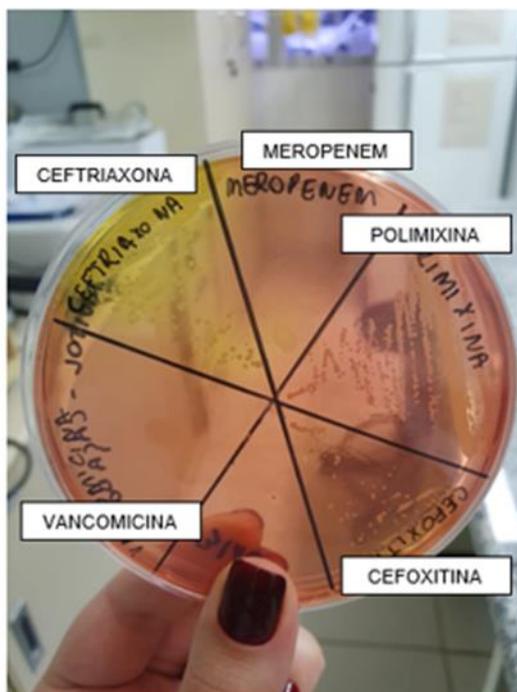
Figura 35. Reisolamento das colônias dos meios MacConkey e Manitol Salgado, no meio Chromagar Orientation PlastLabor® do transporte da cidade de Zortéa. Fonte: autora



Coleta do transporte da cidade de Caçador

Figura 36. Isolamento em meios Manitol salgado e MacConkey das amostras do transporte de Caçador. Fonte: autora.

Ágar Manitol salgado



Ágar MacConkey

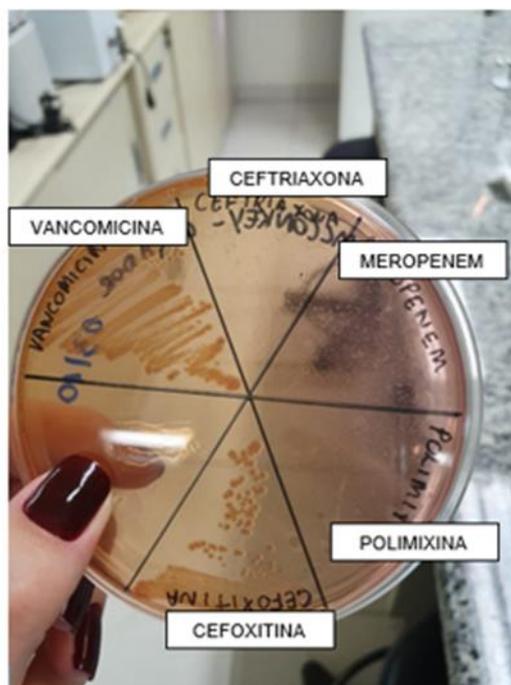
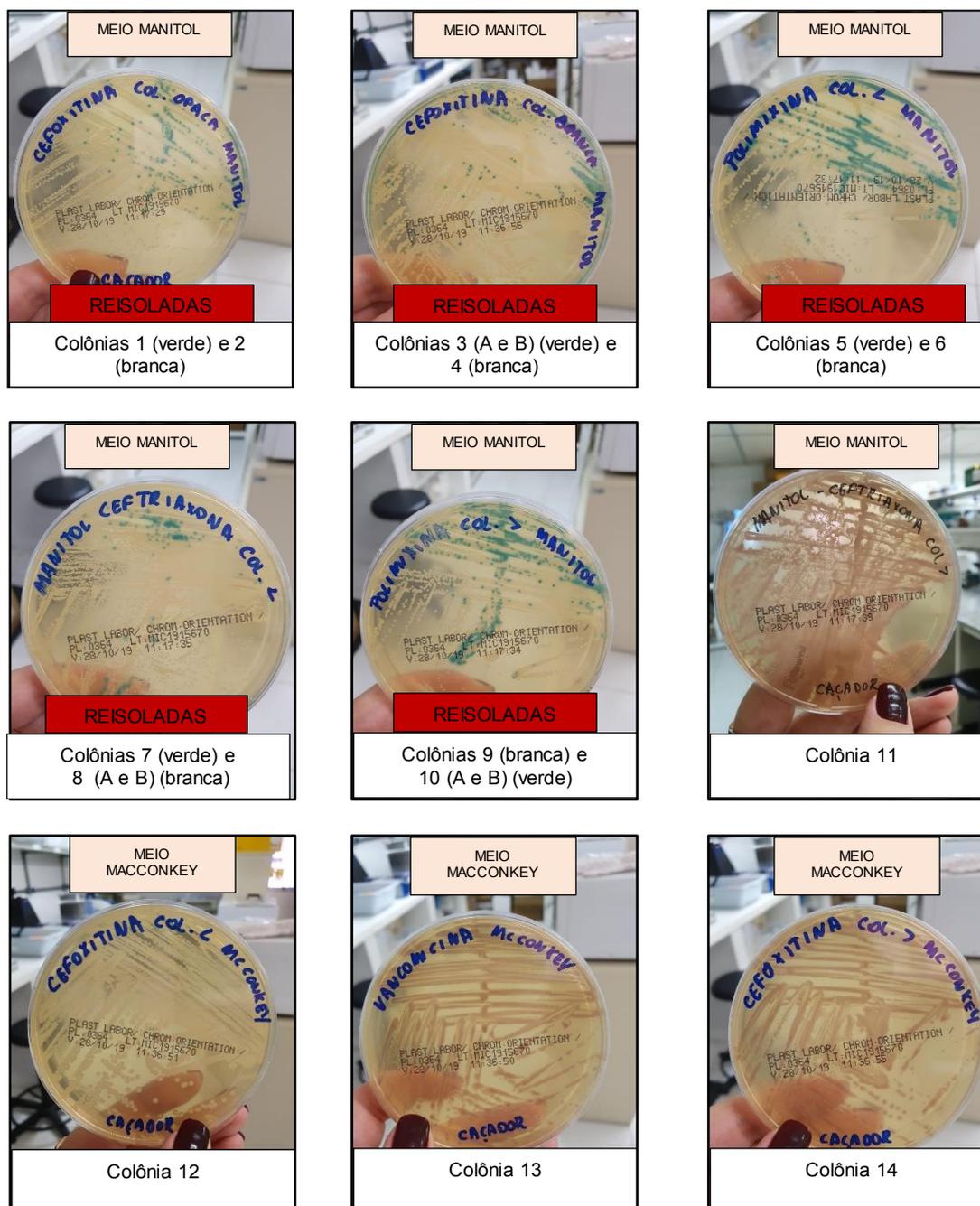


Figura 37. Reisolamento das colônias dos meios MacConkey e Manitol Salgado, no meio *Chromagar Orientation PlastLabor*[®] do transporte da cidade de Caçador. Fonte: autora.



Algumas placas ainda apresentaram crescimento de mais de uma colônia e precisaram passar por outro processo de reisolamento em meio *Chromagar Orientation PlastLabor*, como é descrito nas figuras anteriores. A partir do isolamento de todas as colônias obtidas, essas foram numeradas para auxiliar no processo de identificação com os testes bioquímicos, totalizando 33 colônias.

6.3.2 IDENTIFICAÇÃO POR TESTES BIOQUÍMICOS E METODOLOGIA MALDI-TOF DAS COLÔNIAS OBTIDAS

Todas as colônias isoladas e identificadas inicialmente por testes bioquímicos foram identificadas pela metodologia MALDI-TOF pelo aparelho VITEK®MS bioMérieux Brasil.

As bactérias identificadas a partir dos testes bioquímicos e metodologia MALDI-TOF são descritas nos **Quadro 2** a **Quadro 7**, tais quadros auxiliam na comparação dos resultados obtidos com as duas metodologias.

Identificação das colônias isoladas do transporte da cidade de Caçador.

Quadro 2 . Identificação de bactérias Gram positivas isoladas do transporte da cidade de Caçador.

Colônia	Gram +									Testes bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Catalase	Coagulase	Hemólise	BEA	NaCl	Optoquina	CAMP	Bacitracina		
1	Positivo	Negativa		Alfa	Positiva	Negativa	-	-	-	Grupo D	<i>Enterococcus faecium</i>
2	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3A	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus ssp</i> CN	<i>Enterococcus faecium</i>
3B	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
4	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus ssp</i> CN	<i>Staphylococcus warneri</i>
5	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	-	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
6	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
8A	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	-	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
8B	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus ssp</i> CN	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
9	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
10A	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	-	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	Não determinada
10B	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus ssp</i> CN	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus ssp</i> CN	<i>Pantoea agglomerans</i>

* A prova da Coagulase foi realizada em lâmina. Entretanto, devido a possíveis resultados falso positivos ou negativos, pode haver discrepâncias em relação à espécie identificada por MALDI-TOF. CN = Coagulase negativa. (-) = teste não realizado para a espécie suspeita. Fonte: autora.

Quadro 3. Identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Caçador.

Colônia	Gram - Fermentadoras											Testes bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Lactose	LTD	Glicose	Gás	Lisina	Motilidade	Ornitina	Indol	Citrato	Rhamnose		
13	Negativo	Negativa	Positivo	Positiva	Negativo	Negativa	Positiva	Negativa	Negativo	Negativo	Positiva	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
14	Negativo	Negativa	Positivo	Positiva	Negativo	Negativa	Positiva	Negativa	Negativo	Negativo	Positiva	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Fonte: autora.

Quadro 4 - Identificação de bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Caçador.

Colônia	Gram - Não Fermentadoras								Teste bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Oxidase	Motilidade BHI	Crescimento BHI a 42°C	Cetrimide	Xilose	Maltose	Lactose		
12	Negativo	Negativa	Negativa	Negativo	Negativo	Negativa	Negativa	Negativa	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>

Fonte: autora

Identificação das colônias isoladas do transporte da cidade de Zortéa.

Quadro 5. Identificação de bactérias Gram positivas isoladas do transporte da cidade de Zortéa.

Colônia	Gram +									Teste bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Catalase	Coagulase	Hemólise	BEA	NaCl	Optoquina	CAMP	Bacitracina		
1A	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	-	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
7	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp</i> CN	<i>Staphylococcus aureus</i>
5A	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	-	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
8	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
9	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp</i> CN	<i>Bacillus spp.</i>
12	Positivo	Negativa	-	Alfa	Positiva	Positiva	Resistente	-	-	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
13	Positivo	Positiva	Negativa	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp</i> CN	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14	Positivo	Positiva	Positiva	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

* A prova da Coagulase foi realizada em lâmina. Entretanto, devido a possíveis resultados falso positivos ou negativos, pode haver discrepâncias em relação à espécie identificada por MALDI-TOF. CN = Coagulase negativa. (-) = teste não realizado para a espécie suspeita. Fonte: autora.

Quadro 6. Identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Zortéa.

Colônia	Gram – Fermentadoras												Testes bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Lactose	SIM (H ₂ S)	Indol	VM	VP	Citrato	Lisina	Arginina	Ornitina	Arabinose	Xilose		
2	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo	-	-	Positivo	Positiva	-	Positiva	Negativa	-	<i>Serratia marcescens</i>	Não determinada
5B	Negativo												Não determinada	<i>Pseudomonas putida</i>
10	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo	-	-	Positivo	Positiva	-	Positiva	Negativa	-	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
11	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo	-	-	Positivo	Positiva	-	Positiva	Negativa	-	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>

Fonte: autora

Quadro 7. Identificação de bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose isoladas do transporte da cidade de Zortéa.

Colônia	Gram - Não Fermentadoras									Testes bioquímicos	MALDI-TOF
	Gram	Oxidase	Motilidade BHI	Crescimento BHI a 42°C	Cetrimide	Xilose	Maltose	Lactose			
1B	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positiva	<i>Acinetobacter spp.</i>	Não determinada	
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positiva	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	
6	Negativo	Negativo	Positiva	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>	Não determinada	

Fonte: autora

Em relação à identificação realizada por testes bioquímicos, no transporte da cidade de Caçador foram analisadas 17 colônias, das quais 29% foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, 29% *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, 6% *Acinetobacter spp.*, 18% *Enterococcus spp.*, 6% *Streptococcus* do grupo D e 12% *Pantoea agglomerans*, conforme é apresentado na **Figura 38**.

Já pela metodologia MALDI-TOF foram analisadas as mesmas colônias, das quais 29% foram identificadas como *Enterococcus faecium*, 24% *Staphylococcus epidermidis*, 12% *Staphylococcus warneri*, 6% *Staphylococcus hominis*, 12% *Pantoea agglomerans*, 6% *Staphylococcus saprophyticus* e 6% *Acinetobacter iwoffii* e 6% não foi possível determinar sua identificação, conforme é apresentado na **Figura 39**.

Figura 38. Gráfico das bactérias identificadas através de testes bioquímicos do transporte da cidade de Caçador. Fonte: autora.

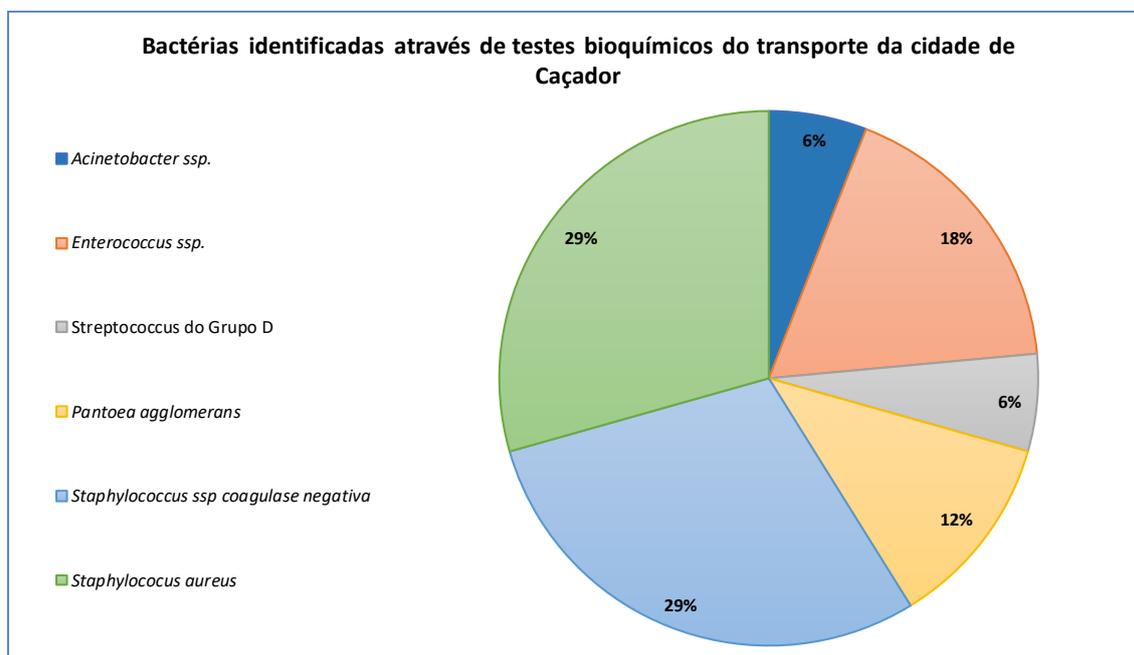
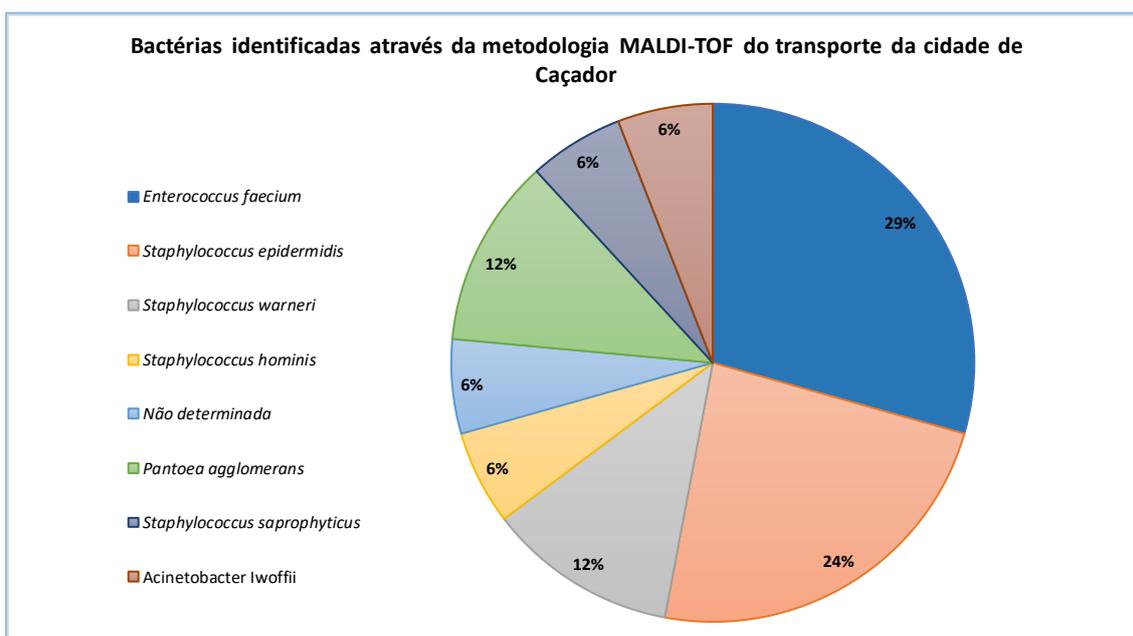


Figura 39. Gráfico das bactérias identificadas através da metodologia MALDI-TOF do transporte da cidade de Caçador. Fonte: autora.



No transporte da cidade de Zortéa através dos testes bioquímicos foram analisadas 16 colônias, das quais 19% foram identificadas como *Serratia marcescens*, 13% *Staphylococcus aureus*, 19% *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, 6% *Stenothrophomonas maltophilia*, 19% *Acinetobacter spp.*, 19% *Enterococcus spp.* e 6% não foi possível determinar sua identificação, conforme é apresentado na **Figura 40**.

Pela metodologia MADIL-TOF foram analisadas as mesmas colônias, das quais 19% foram identificadas como *Enterococcus casseliflavus*, 19% *Staphylococcus aureus*, 6% *Staphylococcus epidermidis*, 25% *Pseudomonas putida* e 6% *Pseudomonas viridiflava*, 6% *Bacillus spp.* e 19% não foi possível determinar sua identificação, conforme é apresentado na **Figura 41**.

Figura 40. Gráfico das bactérias identificadas através de testes bioquímicos do transporte da cidade de Zortéa. Fonte: autora.

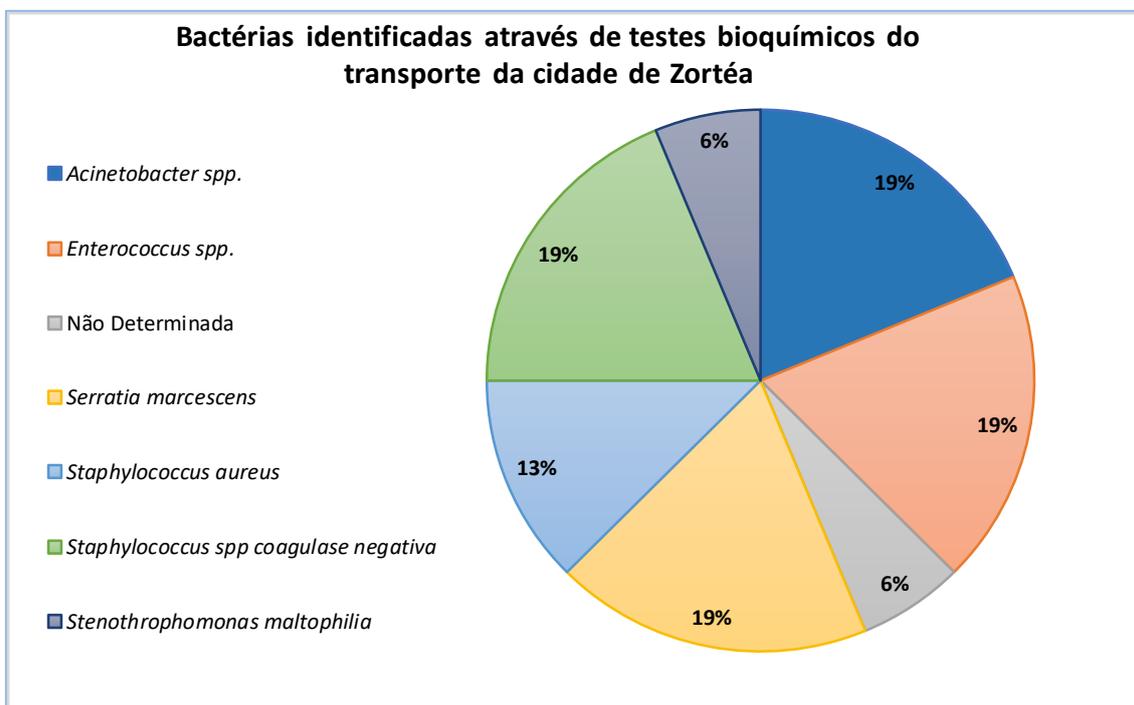
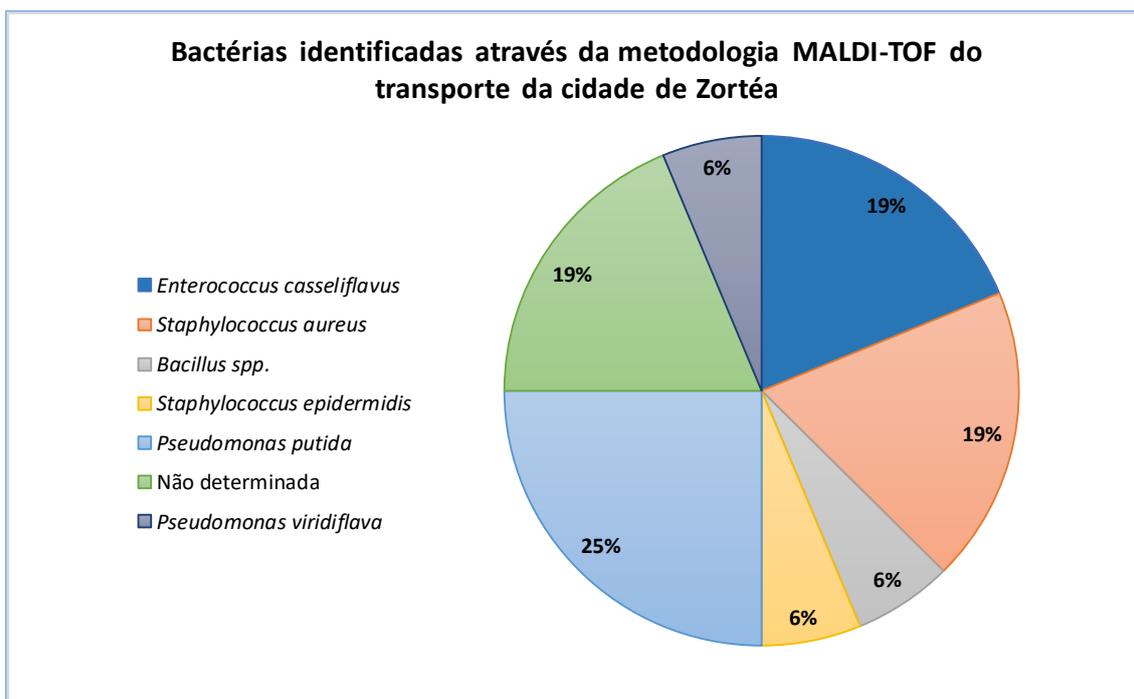


Figura 41. Gráfico das bactérias identificadas através da metodologia MALDI-TOF do transporte da cidade de Zortéa. Fonte: autora



As bactéria identificadas caracterizam-se por colonização da pele, via respiratória, aparelho digestivo e urinário em seres humanos e, outras colônias

apresentam colonização oriunda de solo e superfícies ambientais. Tais bactérias isoladamente não apresentam caráter patogênico, porém, quando em contato com pacientes que já apresentam um nível de imunodepressão, essas podem se tornar oportunistas e ocasionarem diferentes processos infecciosos.

6.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Até o momento o TSA foi realizado para 17 colônias. Ressalta-se que o TSA foi realizado a partir da identificação por testes bioquímicos pois a identificação pela metodologia MALDI-TOF foi feita posteriormente por um parceiro externo.

A **Tabela 3** e a **Figura 42** mostram as resistências e sensibilidades encontradas nos dois transportes analisados, que exibem de forma quantitativa e comparativa a resistência e sensibilidade referente a cada classe de antimicrobianos, apenas para a classe dos monobactâmicos as bactérias analisadas não apresentaram resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos utilizados. Tais dados foram analisados através da tabela de pontos de corte clínicos do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST).

Na cidade de Caçador é possível identificar uma prevalência de sensibilidade para a maioria das classes de antimicrobianos testadas. Porém, observa-se que algumas colônias apresentaram resistência a diversos antimicrobianos, como colônias de *Staphylococcus aureus* resistente a cefoxitina, o que pode indicar a possível presença do gene MecA e do fenótipo MRS/MRSA. Esse fenótipo confere resistência a todos os beta-lactâmicos testados. A análise do teste de sensibilidade realizado para as amostras do transporte de Caçador é ilustrada no **Quadro 8**.

Para a cidade de Zortéa se observa um perfil geral semelhante de sensibilidade considerando as diferentes classes de antimicrobianos. Entretanto, se destacam os isolados de *Serratia marcescens* que devido a mecanismos intrínsecos de resistência, apresenta resistência ampliada a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalosporinas de primeira geração, cefuroxima, polimixina, cefoxitina e nitrofurantoína. A análise

do teste de sensibilidade realizado para as amostras do transporte de Zortéa é ilustrada no **Quadro 9**.

Os isolados de ambas as cidades apresentaram resistência acima de 30% aos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos, as principais classes utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas.

Baseando-se na classificação proposta por Magiorakos (2012) 58,82% das colônias foram caracterizadas como multidroga resistente (MDR – *multidrug-resistant*), ou seja, não susceptível a pelo menos 1 agente em pelo menos 3 categorias de antimicrobianos.

Ao realizar o teste, os discos de antimicrobianos foram dispostos de forma a identificar não somente a resistência presente em cada disco, mas também outros possíveis mecanismo de resistência, como a resistência induzível à clindamicina, através do achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina, fenótipo MLS_B positivo e ESBL através do processo de sinergismo (“Ghost- Zone”) através da aproximação dos discos de Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg e Cefotaxime 5µg, conforme já ilustrado nas **Figura 26** e **Figura 27**. Entretanto esses mecanismos de resistência não foram identificados em nenhum isolado.

Quadro 8. Quadro do teste de sensibilidade realizado para amostras do transporte da cidade de Caçador.

Asteriscos (*) representam resistência intrínseca aos antimicrobianos utilizados. Células em branco indicam antimicrobianos testados, porém não presentes na tabela de pontos de corte clínicos do BrCAST.

	Cefalosporinas						Carbapenêmicos			Penicilinas				Aminoglicosídeos			Macrolídeos		Tetracíclicas	Fluoroquinolonas			Agentes diversos		Glicopeptídeos	Monobactâmicos			
	Cefotaxima 5µg	Cefepima 30µg	Cefuroxima 30µg	Cefalexina 30µg	Cefoxitina 30µg	Ceftazidima 10µg	Ceftriaxona 30µg	Imipenem 10µg	Meropenem 10µg	Ertapenem 10µg	Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg	Ampicilina + Sulbactam 10/10µg	Piperacilina + tazobactam 30/6µg	Ampicilina 10µg	Amicacina 30µg	Gentamicina 10µg	Tobramicina 10µg	Eritromicina 15µg	Clindamicina 2µg	Tigeciclina 15µg	Levofloxacina 5µg	Ciprofloxacina 5µg	Ácido Nalidíxico 30µg	Fosfomicina 200µg	Nitrofurantoina 100µg	Sulfametoxazol + Trimetoprim 23,75/1,25 µg	Vancomicina 5µg	Aztreonam 30µg	
Colônia 1 - <i>Streptococcus</i> do grupo D	R	R	R				R				S	S	S					R											x
Colônia 2 - <i>Staphylococcus aureus</i>		S		S	S	*		S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S*	S	S					R	x		
Colônia 3A - <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase Negativa		R		R	R	*		R	R	R	S	S	S		R	R	R	R	R	S*	S	S				S	x		
Colônia 4 - <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase Negativa		S		S	S	*		S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S*	S	S				S	x			
Colônia 5 - <i>Enterococcus spp.</i>							S				S	S	S						S*	S	S					S			
Colônia 8B - <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase Negativa		R		R	R	*		R	R	R	S	S	S		S	S	R	R	S	S*	S	S				S	x		
Colônia 10B - <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase Negativa		S		S	S	*		S	S	S	S	S	S		S	S	R	S	S	S*	S	S				S	x		
Colônia 11 - <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase Negativa		S		S	S	*		S	S	S	S	S	S		S	R	R	S	S	S*	S	S				S	x		
Colônia 12 - <i>Acinetobacter calcoceticus spp</i>	*						*	S	S	*	*		*	S	S	R				S	R		*		R*	x	*		
Colônia 13 - <i>Pantoea agglomerans</i>	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S		S	S	S			S	S	S		S	S	S	x			

S Sensível
R Resistente

Fonte: autora.

Quadro 9. Quadro do teste de sensibilidade realizado para amostras do transporte da cidade de Zortéa. Asteriscos (*) representam resistência intrínseca aos antimicrobianos utilizados. Células em branco indicam antimicrobianos testados, porém não presentes na tabela de pontos de corte clínicos do BrCAST.

	Cefalosporinas						Carbapenêmicos			Penicilinas			Aminoglicosídeos			Macrolídeos		Tetraciclina	Fluoroquinolonas			Agentes diversos		Glicopeptídeos	Monobactâmicos			
	Cefotaxima 5µg	Cefepima 30µg	Cefuroxima 30µg	Cefalexina 30µg	Cefoxitina 30µg	Ceftazidima 10µg	Ceftriaxona 30µg	Imipenem 10µg	Meropenem 10µg	Ertapenem 10µg	Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg	Ampicilina + Sulbactam 10/10µg	Piperacilina + tazobactam 30/6µg	Ampicilina 10µg	Amicacina 30µg	Gentamicina 10µg	Tobramicina 10µg	Eritromicina 15µg	Clindamicina 2µg	Tigeciclina 15µg	Levofloxacina 5µg	Ciprofloxacina 5µg	Ácido Nalidixico 30µg	Fosfomicina 200µg	Nitrofurantoina 100µg	Sulfametoxazol + Trimetoprim 23,75/1,25 µg	Vancomicina 5µg	Aztreonam 30µg
Colônia 1A - <i>Enterococcus</i> spp							S			S	S	S							S*	S	S			S	R	S		
Colônia 1B - <i>Acinetobacter baumannii</i>	*			*		*	S	S	*	*	*	*	*	S	S	S				S	R		*	S	R*	x	*	
Colônia 2 - <i>Serratia marcescens</i>	R	R	R*	R*	*		R	S	R	R	R*	R*	S	*	S	S	S		R	R	R			R*	R	x	x	
Colônia 6 - <i>Stenothrophomonas maltophilia</i>																										R	x	
Colônia 7 - <i>Staphylococcus</i> spp Coagulase Negativa		S		S	S	*		S	S	S	S	S		R	R	R	S	S	S*	S	S				R	R	x	
Colônia 9 - <i>Staphylococcus</i> spp Coagulase Negativa		S		S	S	*		S	S	S	S	S		R	S	R	S	R	S*	S	S			R	R	x		
Colônia 14 - <i>Staphylococcus Aureus</i>		S		S	S	*		S	S	S	S	S		S	R	R	S	S	S*	S	S			S	R	x		

S Sensível
R Resistente

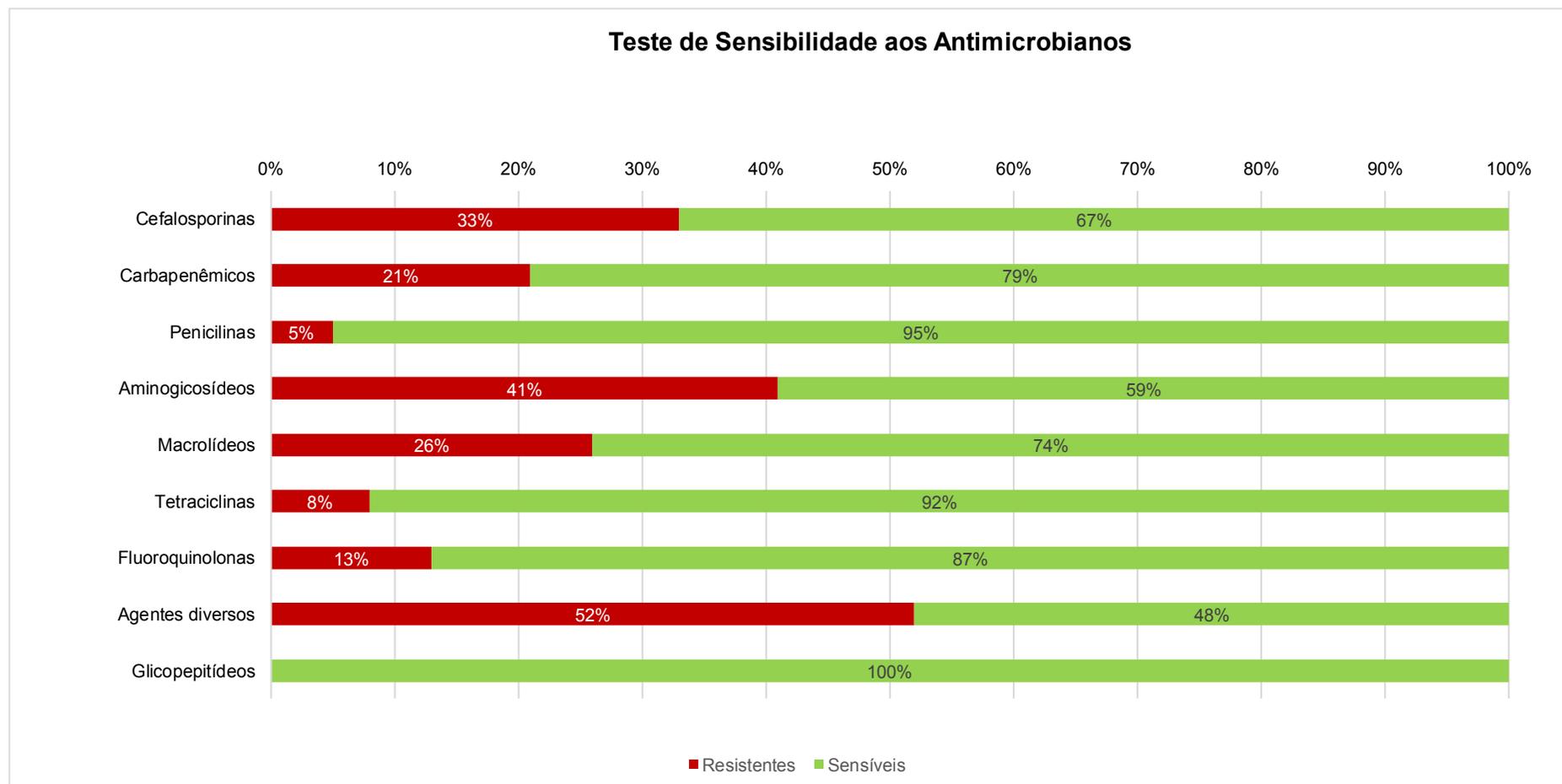
Fonte: autora.

Tabela 3. Análise quantitativa de bactérias resistentes e sensíveis aos antimicrobianos testados, para o transporte da cidade de Caçador e Zortéa.

Classe de antimicrobianos	Transporte da Cidade de Caçador				Transporte da Cidade de Zortéa				Totais dos transportes das duas cidades			
	Resistentes		Sensíveis		Resistentes		Sensíveis		Resistentes		Sensíveis	
Cefalosporinas	9	35%	17	65%	4	31%	9	69%	13	33%	26	67%
Carbapenêmicos	6	25%	18	75%	2	13%	13	87%	8	21%	31	79%
Penicilinas	0	0%	27	100%	2	13%	13	87%	2	5%	40	95%
Aminoglicosídeos	9	38%	15	63%	7	47%	8	53%	16	41%	23	59%
Macrolídeos	4	31%	9	69%	1	17%	5	83%	5	26%	14	74%
Tetraciclina	0	0%	8	100%	1	20%	4	80%	1	8%	12	92%
Fluoroquinolonas	1	6%	17	94%	3	25%	9	75%	4	13%	26	87%
Agentes diversos	2	20%	8	80%	9	82%	2	18%	11	52%	10	48%
Glicopeptídeos	0	0%	1	100%	0	0%	1	100%	0	0%	2	100%

Fonte: autora.

Figura 42. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) de todas as colônias analisadas. Fonte: autora.



A colonização bacteriana ocorre frequentemente devido a uma transmissão direta ou indireta, de pessoa para pessoa, devido à higiene inadequada. Dependendo do material, as bactérias presentes em determinada superfície podem sobreviver entre 1 e 56 dias fora do organismo hospedeiro. Diferentes trabalhos relatam que as ambulâncias podem constituir um reservatório de bactérias multirresistentes e que o transporte de um paciente infectado com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) acarreta um aumento de risco de contaminação ambiental após apenas 10 minutos. Além disso, já é conhecido o risco de transferência de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) do paciente para o ambiente hospitalar (VIKKE; GIEBNER, 2016). Para as demais bactérias que apresentaram resistência a alguma classe de antimicrobianos, não foram encontrados trabalhos na literatura que justifiquem a presença dessas bactérias resistentes e como essas atuariam no meio.

É preciso considerar que o controle de infecção no âmbito pré-hospitalar enfrenta diversos desafios. Primeiramente, o cenário pré-hospitalar apresenta uma rotatividade constante, onde um paciente substitui o outro. Além disso, para ambulância de caráter emergencial, a equipe presente encontra uma grande variedade de ambientes, por exemplo, ambientes de rodovias, ambientes agrícolas e casas de repouso, o que torna esses transportes vulneráveis aos mais diversos microrganismos. No entanto, a limpeza rotineira dessas ambulâncias entre os cursos dos pacientes deve ser priorizada, para reduzir a contaminação bacteriana (VIKKE; GIEBNER, 2016).

Portanto, áreas em contato direto com os pacientes parece ser a fonte mais persistente de contaminação. No entanto, para a garantia do transporte desses pacientes de modo seguro, impedindo o desenvolvimento de infecções graves ou com risco de vida, deve-se refletir nas diretrizes de desinfecção e na educação continuada relacionada (WEPLER *et al.*, 2015).

7 CONCLUSÃO

A partir dos testes realizados para padronização do kit e swab para o procedimento de extração de DNA, foi selecionado para o uso no projeto “Dinâmica da Circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal” o swab da linha SRK flocado da Copan Italia® para a coleta de amostras de superfície nos transportes de pacientes e a utilização do ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit para a extração do DNA total das amostras obtidas.

Através dessa padronização foi possível realizar as coletas dos transportes selecionados e a extração do DNA presente. Todas as amostras apresentaram valores de concentração inferiores as 20 ng/μl e assim os resultados de A260/280 e A260/230 não são confiáveis. A qualidade das amostras será validada posteriormente por sequenciamento.

Para a formação do biorrepositório foi possível isolar 33 colônias e as mesmas sofreram o processo de identificação fenotípica através de testes bioquímicos convencionais e espectrometria de massas (MALDI-TOF), com algumas discrepâncias que serão posteriormente confirmadas.

Do número total de colônias, aproximadamente 21% foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, 24% *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, 12% *Acinetobacter spp.*, 18% *Enterococcus*, 3% *Streptococcus* do grupo D, 6% *Pantoea agglomerans*, 9% *Serratia marcescens*, 3% *Stenothrophomonas maltophilia* e 3% não foi possível determinar sua identificação. Resultados obtidos através de testes bioquímicos.

Os isolados de ambas as cidades apresentaram resistência acima de 30% aos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos, as principais classes utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas. E 58,82% das colônias foram caracterizadas como multidroga resistente (MDR – *multidrug-resistant*), não sendo identificados os fenótipos MLS_B e ESBL nas colônias analisadas.

A maioria das bactérias identificadas apresentam característica de colonização da pele, via respiratória, do aparelho digestivo e urinário em seres humanos. Outras, apresentam colonização oriunda do solo e superfícies ambientais. Todas identificadas apresentam baixo potencial patogênico, porém

essas podem atuar como oportunistas em casos específicos, como em imunodeficiência e sua presença em ambiente hospitalar.

As características das bactérias identificadas permitem concluir que sua presença nos transportes de pacientes podem ser indícios de condições de higiene inadequadas.

SUGESTÕES

Através dos resultados obtidos sugere-se um maior controle dos processos de higienização e desinfecção realizados nos transportes de pacientes, sejam esses transportes de emergência ou não. A conscientização e a preocupação dos motoristas sobre o assunto foi observada durante todas as coletas, portanto, é necessário o desenvolvimento de projetos de extensão ou de pesquisa que envolva a realização ou ensinamento da higienização de modo adequado desses veículos. O treinamento pode seguir as diretrizes do documento (SCIH / CCIH, 2007), em que são descritos os processos de limpeza e desinfecção diária em transportes de pacientes de caráter emergencial.

REFERÊNCIAS

ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. 8ª edição**, Editora Guanabara Koogan, 2003.

AMBRUS, CHEN, DAI, BIALIS, JONES, YANG. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 9, p. 2723–2735, 2006.

ANVISA. **Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm>. Acesso em: 19 out. 2019.

ANVISA. **MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**, 2013. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/procedimentos-laboratoriais-da-requisicao-do-exame-a-analise-microbiologica-e-laudo-final>>

ASTA. **MALDI-TOF MS**. Disponível em: <http://astams.co.kr/asta_/en/technology/malдитofms.php>.

ATLAS, R. M. One Health: its origins and future. In: **One Health: the human-animal-environment interfaces in emerging infectious diseases**. Springer, 2012. p. 1–13.

AU - DESJARDINS, P.; AU - CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **JoVE**, n. 45, p. e2565, 2010.

BARROS, R. W. C. B. **Uso responsável de medicamentos veterinários na produção animal - Parte I**. 2013

BARTLETT, J. M. S.; WHITE, A. Extraction of DNA from whole blood. In: **PCR Protocols**. Springer, 2003. p. 29–31.

BAUER, KIRBY, SHERRIS, TURCK. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4_{ts}, p. 493–496, 1966.

BIOCHROM. **NANOVUE PLUS™ SPECTROPHOTOMETER**. Disponível em: <https://biochromspectros.com/spectrophotometers/nanovue-plus-cat/nanovue-plus-spectrophotometer.html?__SID=U>. Acesso em: 18 ago. 2019.

BOOM, SOL, SALIMANS, JANSEN, WERTHEIM-VAN DILLEN, VAN DER NOORDAA. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

CARNEIRO, FERRAZ, BUENO, KOCH, FORESTI, LENA, MACHADO, RAUBER, KRUMMENAUER, LAZAROTO. O uso de antimicrobianos em um

hospital de ensino: uma breve avaliação. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 421–424, 2011.

CASTRO, PILGER, FERREIRA, KOPITKE. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 553–558, 2002.

CDC. **One Health**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

CHEN, WU, CHEN, LIU, DENG, PENG. The impact of different DNA extraction methods on the analysis of microbial diversity of oral saliva from healthy youths by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Dental Sciences**, v. 11, n. 1, p. 54–58, mar. 2016.

CIB. **A mulher que fotografou o DNA: conheça Rosalind Franklin**. Disponível em: <<https://cib.org.br/mulher-que-fotografou-o-dna-conheca-rosalind-franklin/>>. 2016. Acesso em: 1 ago. 2019.

COMMONER, B. Failure of the Watson–Crick Theory as a Chemical Explanation of Inheritance. **Nature**, v. 220, n. 5165, p. 334–340, 1968.

COPAN ITALIA. **eSwab - Package insert and How to use guide**, 2016. Disponível em: <http://www.copanusa.com/files/4214/9580/9714/HPC030_eSwab_copoliestere_Rev00_Date2016.02.pdf>

DATAMED. **QUANTIFICAÇÃO FOTOMÉTRICA DE DNA E A ANÁLISE CRÍTICA DE SEU PROCESSO DE EXTRAÇÃO**. 2017. Disponível em: <<https://datamedweb.com.br/2019/02/quantificacao-fotometrica-de-dna-e-a-analise-critica-de-seu-processo-de-extracao/>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

DE QUEIROZ, N. S. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, p. 64–70, 2004.

ELKIN, L. O. Rosalind Franklin and the double helix. **Physics Today**, v. 56, n. 3, p. 42–48, 2003.

ELKINS, K. M. Chapter 4 - DNA Extraction. In: ELKINS, K. M. (Ed.). **Forensic DNA Biology**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 39–52.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FIORAVANTI, C. H. **FUNGOS, INSTITUIÇÕES, MÁQUINAS E PESSOAS EM NEGOCIAÇÃO: O PERCURSO DO FÁRMACO P-MAPA**. 2010.

FISHER SCIENTIFIC. **Promega ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System**. 2019. Disponível em: <<https://www.fishersci.ca/shop/products/promega>>

reliaprep-gdna-tissue-miniprep-system-2/p-4390062>. Acesso em: 21 ago. 2019.

FONTANA, WETLER, AQUINO, ANDRIOLI, QUEIROZ, FERREIRA, NASCIMENTO, DELABIE. Disseminação de bactérias patogênicas por formigas (Hymenoptera: Formicidae) em dois hospitais do nordeste do Brasil. **Neotrop Entomol**, v. 39, n. 4, p. 655–663, 2010.

FOX, S. I. **Fisiología humana**. 14. ed. 2016

HARE, R. New light on the history of penicillin. **Medical History**, v. 26, n. 1, p. 1–24, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Demográfico 2010**, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 5 nov. 2014

KHAN ACADEMY. **Descoberta do DNA**. 2019. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/discovery-of-the-structure-of-dna>. Acesso em: 1 ago. 2019.

KOETSIER GIRON, C. E. **A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers**. 2019. USA:. Disponível em: <https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?la=en&rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc>.

LOCCUS. **Disruptor de células e tecidos – L-BEADER 6**. 2019. Disponível em: <https://loccus.com.br/produto/disruptor-l-beader-6/>. Acesso em: 21 ago. 2019.

LOUREIRO, ROQUE, RODRIGUES, HERDEIRO, RAMALHEIRA. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, p. 77–84, 2016.

MAGIORAKOS, SRINIVASAN, CAREY, CARMELI, FALAGAS, GISKE, HARBARTH, HINDLER, KAHLMETER, OLSSON-LILJEQUIST. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARODIN, SALGUEIRO, MOTTA, SANTOS. Brazilian guidelines for biorepositories and biobanks of human biological material. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 1, p. 72–77, 2013.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.

MEDICAL EXPO. **SWAB DE MICROBIOLOGIA / PARA TRANSPORTE COM MEIO**. 2019. Disponível em: <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/copan-italia/product-68105-525059.html>. Acesso em: 19 ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de GRAM**, 2001. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf>

MONTOYA C, MIRA O, ÁLVAREZ A, COFRE G, COHEN V, DONOSO W, TORRES T. Resistencia inducible a clindamicina en Staphylococcus aureus meticilino resistente. **Revista chilena de pediatría**, v. 80, n. 1, fev. 2009.

MWANGI, W.; DE FIGUEIREDO, P.; CRISCITIELLO, M. F. One Health: Addressing Global Challenges at the Nexus of Human, Animal, and Environmental Health. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005731–e1005731, 15 set. 2016.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**, 2014.

OLIVEIRA, REGITANO, ROESE, ANTHONISEN, PATROCINIO, PARMA, SCAGLIUSI, TIMÓTEO, BELICUAS. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, S. M. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4 ed ed. 2019.

ORGANIZATION, W. H. **WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health**. 2014. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

ORGANIZATION, W. H. **GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1>

ORION CIENTIFICO. **Swab Para Coleta De Amostras Estéril C/100 Und Global**. 2019. Disponível em: <<https://www.orionprodutoscientificos.com.br/swab-para-coleta-de-amostras-esteril-c-100-und-global>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: Maldi-Tof. **Einstein**, v. 10, p. 118–119, 2012.

QUESSADA, A. M. USO DE MEDICAMENTOS SEM PRESCRIÇÃO MÉDICO-VETERINÁRIA-COMUNICAÇÃO. **Veterinária Notícias Veterinary News**, v. 16, n. 1, 2012.

RABINOWITZ, NATTERSON-HOROWITZ, KAHN, KOCK, PAPPALIOANOU. Incorporating one health into medical education. **BMC medical education**, v. 17, n. 1, p. 45, 23 fev. 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4a ed ed. Rio de Janeiro: 2001

REGITANO, L. C. DE A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2001.

ROCHA, M. A.; CARNEIRO, P. M.; CASTILHO, S. R. Estudo da utilização de medicamentos antimicrobianos de 2003 à 2004 em pacientes adultos em hospital terciário no Rio de Janeiro. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 1, p. 50–53, 2009.

ROSELINO, A. M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 187–203, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)**. Cold spring harbor laboratory press New York, 2001. v. 999

SCHERER, J. DE S. **FATORES DE RISCO PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM HOSPITAL ESPECIALIZADO**, 2012.

SCIH / CCIH. **BIOSSEGURANÇA PARA AMBULÂNCIAS**, 2007. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/3911058-Biosseguranca-para-ambulancias.html>>

SEJAS, SILBERT, REIS, SADER. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 27–35, 2003.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The organic chemistry of drug design and drug action**. Academic press, 2014.

SMITH, GOLDBERG, ROSENTHAL, CARLSON, CHEN, CHEN, RAMACHANDRAN. Global rise in human infectious disease outbreaks. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140950, 2014.

STRASSER, B. J. Who cares about the double helix? **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 803–804, 2003.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TELES CALDART, MARCON CHIAPPETTA, FRANCO LOPES, RAVAZZOLO. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, 2011.

VARALDO, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 1–4, 2002.

VIKKE, H. S.; GIEBNER, M. POSAiDA: presence of *Staphylococcus aureus*/MRSA and *Enterococcus*/VRE in Danish ambulances. A cross-sectional study. **BMC research notes**, v. 9, n. 1, p. 194, 2016.

WEPLER, STAHL, VON BAUM, WILDERMUTH, DIRKS, GEORGIEFF, HAFNER. Prevalence of nosocomial pathogens in German ambulances: the SEKURE study. **Emergency Medicine Journal**, v. 32, n. 5, p. 409–411, 2015.

WHO. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO. **WHO Policy Perspectives on Medicines**, v. 10, 2005.

WHO. **GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1>

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 474–481, 1997.

ZINSSTAG, SCHELLING, WALTNER-TOEWS, TANNER. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive veterinary medicine**, v. 101, n. 3–4, p. 148–156, 2011.

ZYMO RESEARCH. **ZymoBIOMICS DNA Kits**. Disponível em: <<https://www.zymoresearch.com/collections/zymbiomics-dna-kits>>. Acesso em: 21 ago. 2019a.

ZYMO RESEARCH. **Lysis Tubes**. Disponível em: <<https://www.zymoresearch.com/pages/lysis-tubes>>. Acesso em: 21 ago. 2019b.