



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE- CCS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Francielli Tavares Machado

**Caracterização de bactérias multirresistentes isoladas de pacientes internados no
Hospital Universitário/ UFSC**

Florianópolis

2020

Francielli Tavares Machado

**Caracterização de bactérias multirresistentes isoladas de pacientes internados no
Hospital Universitário/ UFSC**

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
2020

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

Machado, Francielli

Caracterização de bactérias multirresistentes isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC / Francielli Machado ; orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero , 2020.

69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Resistência antimicrobiana, resistência a múltiplas drogas (MDR), saúde única, pecuária. I. Marques Sincero , Thaís Cristine . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Francielli Tavares Machado

**Caracterização de bactérias multirresistentes isoladas de pacientes internados no
Hospital Universitário/ UFSC**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Farmácia” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, julho de 2020.

Prof.^a Dr.^a Marení Rocha Farias
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Cleonice Maria Michelin
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Caetana Paes Zamparette
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

A todos que amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado forças e ter me iluminado durante minha trajetória.

Aos meus pais, Frank e Raquel por todo o amor e por estarem sempre ao meu lado me dando forças, me apoiando e sendo meus alicerces. Tudo que sou e onde cheguei devo a vocês.

Ao meu namorado, Lauro Junior por ser meu grande companheiro ao longo desses anos, sempre me ajudando e me motivando.

Aos meus cachorros, Bart e Liza que são meus anjinhos que iluminam e alegram minha vida.

Em especial à minha avó, Lindomar, que não está mais presente entre nós, mas com certeza estará viva no meu coração e nas minhas lembranças.

Aos meus familiares e amigos que amo e que contribuíram de alguma forma com minha formação.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Thais Cristine Marques Sincero, por ter tido papel fundamental na elaboração deste trabalho, obrigada por ter aceitado ser minha orientadora e por realizar este papel grandiosamente.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada-MIMA, por todo o ensinamento e colaboração, sem vocês com certeza este trabalho não poderia ser realizado.

Aos membros da banca, por terem aceitado esse convite e pela contribuição feita a este trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de antimicrobianos modificaram a terapia de doenças infecciosas que antes eram intratáveis, em infecções que podem ser facilmente tratadas. Porém, com a descoberta e o amplo uso desses medicamentos na saúde humana e animal, a resistência bacteriana se tornou um grave problema de saúde pública. Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização de bactérias multirresistentes de pacientes internados no Hospital Universitário / UFSC oriundos do oeste do estado de Santa Catarina. Essa região é a maior produtora de suínos e aves do estado, com extensivo uso de antimicrobianos, aumentando assim a disseminação da resistência entre animais, humanos e meio ambiente. Para a realização deste trabalho foram coletados *swabs* nasal do leito e retal (ou fezes), na internação e na alta, de pacientes admitidos para procedimentos eletivos no HU/UFSC entre agosto de 2019 a fevereiro de 2020. Visando selecionar isolados resistentes, inicialmente as amostras foram inoculadas em caldo TSB contendo 2mg/L dos seguintes antimicrobianos: A) ceftriaxona, para selecionar BGN produtoras de ESBL; B) meropenem, para selecionar BGN produtoras de carbapenemases; C) polimixina B, para selecionar BGN resistentes às polimixinas; D) vancomicina, para seleção de enterococos resistentes à vancomicina (VRE); E) cefoxitina, para seleção de estafilococos resistentes à meticilina. Posteriormente ao crescimento das bactérias resistentes, as mesmas foram isoladas e então foram realizados testes bioquímicos para confirmação da espécie. Foram isoladas 128 bactérias de 13 pacientes, das quais 51,5% são Gram-negativas da ordem Enterobacterales, 41,4% Gram-positivas e 7,1% Gram-negativas não fermentadores da glicose. Após identificação, o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), bem como teste fenotípico de disco-aproximação para pesquisa de Beta-lactamases de Espectro Estendido (fenótipo ESBL) foram realizados para os isolados da ordem Enterobacterales. O perfil de sensibilidade dos isolados mostrou 40 (60,6%) isolados resistentes à ampicilina, 17 (25,7%) resistentes à ampicilina-sulbactam, 19 (28,8%) resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico e 7 (10,6%) resistentes a piperacilina-tazobactam. Em relação às fluoroquinolonas, a resistência ao ciprofloxacino foi observada em 34,9% (23) dos isolados. Os isolados com resistência aos aminoglicosídeos foram 4 (6,0%) resistentes à amicacina, 11 (16,7%) resistentes à gentamicina, 20 (30,3%) resistentes à tobramicina e 10 (15,2%) resistentes à tigeciclina. Considerando as classes de antimicrobianos testadas, 45,5% dos isolados foram classificados como multidroga resistentes (MDR) (não sensível a pelo menos um antimicrobiano em três classes) e 4,5% como extensivamente resistente (XDR) (não sensível a pelo menos um antimicrobiano de todas as classes, exceto duas). Além disso, 13,6% possuem o fenótipo ESBL. Os resultados também demonstram que os pacientes já vieram das suas cidades colonizados com bactérias resistentes, mas também adquiriam no hospital durante a internação. É importante ressaltar que apesar de serem isolados de colonização, não de infecção, mecanismos clinicamente importantes de resistência bacteriana estão circulando entre ambientes hospitalares e comunitários (especialmente da pecuária), evidenciando tanto falha em procedimentos de higienização dentro do hospital, quanto o surgimento e seleção de cepas resistentes na comunidade. Como consequência, o estabelecimento de cepas MDR/XDR, tanto em ambiente hospitalar quanto comunitário, pode comprometer a utilização de diversas classes de antimicrobianos em uma necessidade futura de tratamento de infecções.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, resistência a múltiplas drogas (MDR), saúde única, pecuária.

ABSTRACT

The development of antimicrobials has modified therapy of infectious diseases that were previously intractable, into infections that can be easily treated. However, with the discovery and extended use of these drugs on human and animal health, bacterial resistance became a serious public health problem. This work has as main objective the characterization of multidrug-resistant bacteria of patients admitted to the University Hospital / UFSC from the western Santa Catarina State. This region is the largest producer of pigs and poultry in the state, with extensive use of antimicrobials, thus increasing the spread of resistance among animals, humans and the environment. To perform this work, nasal, hospital bed and rectal swabs (or feces) were collected from patients at their admission and discharge time, by patients admitted for elective procedures at HU/UFSC between August 2019 and February 2020. To select resistant isolates, initially, the samples were inoculated in TSB broth containing 2mg / L of the following antimicrobials: A) ceftriaxone, to select ESBL-producing BGN; B) meropenem, to select carbapenemase-producing BGNs; C) polymyxin B, to select polymyxin-resistant BGNs; D) vancomycin, for selection of vancomycin-resistant enterococci (VRE); and E) ceftiofur, for the selection of methicillin-resistant staphylococci (MRSA). After the resistant bacteria growth, they were isolated, and then biochemical tests were carried out to confirm the species. 128 bacteria were isolated from 13 patients, of which 51.5% are Gram-negative of the order Enterobacterales, 41.4% are Gram-positive and 7.1% are Gram-negative non-fermenters of glucose. After identification, the Antimicrobial Sensitivity Test (TSA), as well as a phenotypic disk-approximation test for the investigation of Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL phenotype), were performed for the Enterobacterales isolates. The sensitivity profile of the isolates showed 40 (60.6%) isolates resistant to ampicillin, 17 (25.7%) resistant to ampicillin-sulbactam, 19 (28.8%) resistant to amoxicillin-clavulanic acid and 7 (10.6%) resistant to piperacillin-tazobactam. Regarding fluoroquinolones, resistance to ciprofloxacin was observed in 34.9% (23) of the isolates. The isolates with resistance to aminoglycosides were 4 (6.0 %) resistant to amikacin, 11 (16.7%) resistant to gentamicin, 20 (30.3%) resistant to tobramycin, and 10 (15.2%) resistant to tigecycline. Considering the classes of antimicrobials tested, 45.5% of the isolates were classified as multidrug-resistant (MDR) (not sensitive to at least 1 antimicrobial in 3 classes) and 4.5% as extensively drug-resistant (XDR) (not sensitive to at least 1 antimicrobial of all classes, except 2). Also, 13.6% have the ESBL phenotype. The results also showed that patients came from their cities colonized with resistant bacteria, but also acquired them in the hospital during hospitalization. It is important to note that despite being isolated from colonization, not from infection, clinically important mechanisms of bacterial resistance are circulating between hospital and community environments (especially livestock), showing both failures in hygiene procedures within the hospital, as well as the emergence and selection resistant strains in the community. Therefore, the establishment of MDR / XDR strains, both in hospital and community settings, may compromise the use of diverse classes of antimicrobials in a future infection treatment need.

Keywords: Antimicrobial resistance, Multidrug resistance (MDR), One Health, Animal Farming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Mecanismos de ação dos antibacterianos.....	15
Figura 2	- Transferências horizontais de genes entre bactérias.....	21
Figura 3	- Mecanismos gerais de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	22
Figura 4	- Classificação das β -lactamases.....	23
Figura 5	- Fluxograma do processamento das amostras.	31
Figura 6	- Placa de ágar manitol salgado mostrando a alteração na coloração de vermelho para amarelo na presença de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figura 7	- Leitura da placa de CHROMagar Orientation Chromogenic BD®.	33
Figura 8	- Placa de ágar MacConkey, mostrando a diferença na coloração de bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.	34
Figura 9	- Teste de aproximação dos discos (“ <i>Ghost-Zone</i> ”). Fenótipo ESBL.	37
Figura 10	- Cidades de residência dos pacientes no oeste e meio-oeste de Santa Catarina...38	
Figura 11	- Esquema de distribuição dos isolados bacterianos.....	41
Figura 12	- Distribuição dos isolados nas amostras de <i>swab</i> retal ou fezes.....	42
Figura 13	- Distribuição dos isolados nas amostras de <i>swab</i> nasal.....	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Testes bioquímicos utilizados para confirmação das bactérias.....	35
Quadro 2 - Antibacterianos que foram usados no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	36
Quadro 3 - Isolados das amostras dos pacientes 10, 11, 12 e 13 que continham amostras de <i>swab</i> do leito.	45
Quadro 4 - Bactérias isoladas nas amostras de internação e alta a partir da seleção com os antimicrobianos	47
Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos	48
Tabela 1 - Variáveis relacionadas a sexo e tempo de internação dos pacientes.....	39
Tabela 2 - Relação do uso de antimicrobianos durante internação dos pacientes.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHRQ	<i>Agency for Healthcare Research and Quality</i>
AMR	<i>Antimicrobial resistance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN	Bactérias Gram-negativas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCast	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEPSH	Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EUA	Estados Unidos da América
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
HU/ UFSC	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
hVISA	<i>Vancomycin heteroresistance in Staphylococcus aureus</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MIMA	Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassete Chromosome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRE	<i>Vancomycin-Resistant enterococci</i>
VRSA	<i>Vancomycin Resistent Staphylococcus aureus</i>
XDR	<i>Extensively drug resistant</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

US \$	Dólar dos EUA
h	Hora
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
ml	Mililitro
mg/L	Miligrama por litro
μl	Microlitro
μg	Micrograma
®	Marca registrada
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

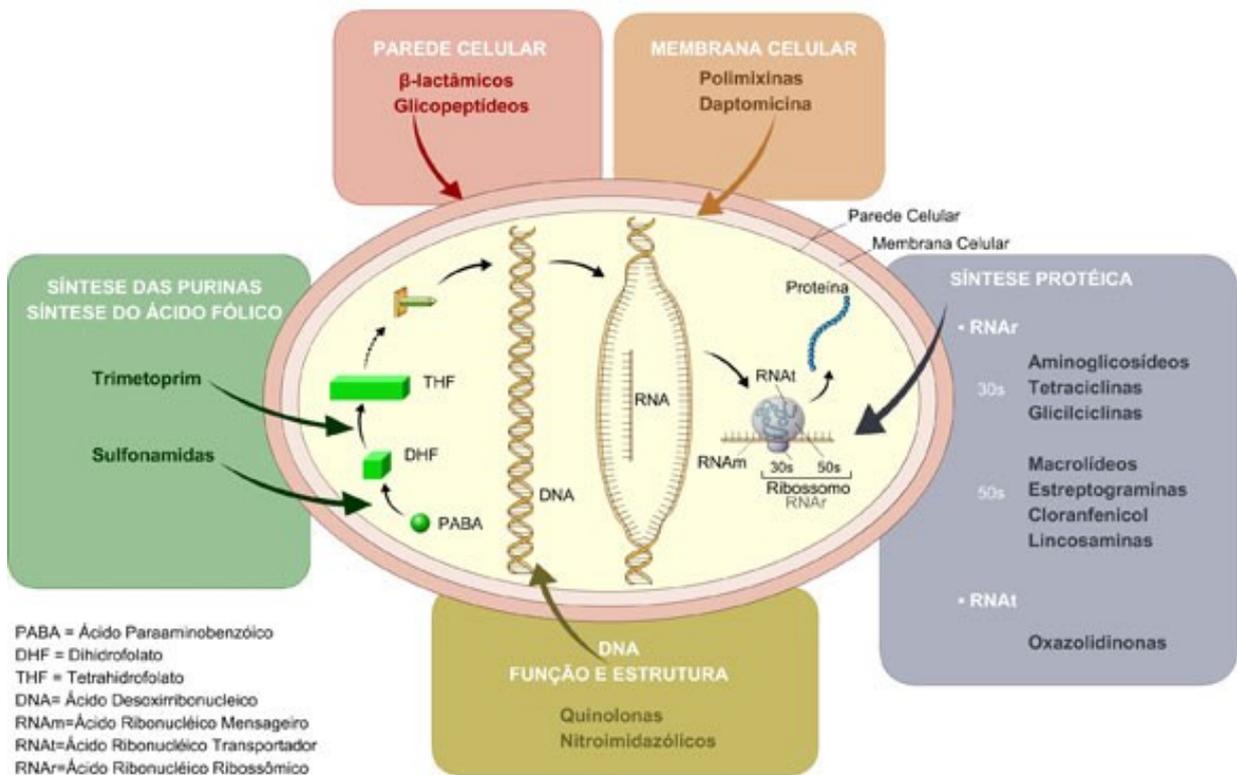
1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
3.2	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	22
3.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS	24
3.4	INFLUÊNCIA DA CRIAÇÃO ANIMAL NA DISSEMINAÇÃO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS	26
3.5	SAÚDE ÚNICA	26
4	JUSTIFICATIVA	28
5	METODOLOGIA.....	29
5.1	RECRUTAMENTO E AMOSTRAGEM.....	29
5.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	29
5.3	COLETA DE AMOSTRAS	30
5.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E SELEÇÃO DE ISOLADOS.....	30
5.4.1	Amostras de <i>swab</i> nasal e <i>swab</i> do leite	31
5.4.2	Amostras de <i>swab</i> retal ou amostra de fezes	33
5.5	TESTES BIOQUÍMICOS	35
5.6	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES	38
6.2	CARACTERÍSTICAS E DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	40
6.3	PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS DE ENTEROBACTERIALES	48
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS	56

8	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	65

1 INTRODUÇÃO

Os antibacterianos são substâncias químicas, que podem ser de origem natural ou sintética e que possuem a capacidade de prevenir ou tratar infecções microbianas. Eles podem ser classificados de acordo com os mecanismos que afetam, como por exemplo, inibição da síntese de DNA, de RNA, da parede celular e de proteínas das bactérias, como mostra a Figura 1, ou classificados de acordo com a sua atividade, sendo capazes de induzir a morte celular – bactericidas – ou inibir o crescimento celular – bacteriostáticas (KOHANSKI, 2010).

Figura 1 - Mecanismos de ação dos antibacterianos.



Fonte: Anvisa, 2007.

A descoberta e o desenvolvimento de antimicrobianos modificaram a terapia de doenças infecciosas que antes eram intratáveis, em infecções que podem ser facilmente tratadas. Concomitantemente ao uso desses medicamentos, houve o aparecimento de cepas resistentes (DAVIES, 2010).

A resistência antimicrobiana foi identificada como uma grave ameaça à saúde humana pela Organização Mundial da Saúde devido à falta de novas classes de antibacterianos

introduzidas no mercado e ao surgimento de cepas bacterianas multirresistentes (CARLET,2011).

Alguns fatores estão intimamente relacionados com o aumento da resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, os fatores relacionados à prescrição médica, o tempo de tratamento menor do que o necessário para combater a infecção e por consequência causando pressão seletiva e selecionando os microrganismos mais resistentes, o uso de antimicrobianos com amplo espectro de ação para tratar infecções simples, assim como o uso de antimicrobianos em infecções não bacterianas. Ademais, a grande circulação de pessoas e animais faz aumentar a disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos, em diferentes partes do mundo (BISHT, 2009).

Os antimicrobianos além de serem utilizados para profilaxia e tratamento de infecções em seres humanos, também são utilizados em grande quantidade na pecuária, não só para fins terapêuticos, mas em doses subterapêuticas como promotores de crescimento animal. Assim, doses baixas, que não são capazes de eliminar grande parte das bactérias patogênicas do organismo do animal, podem ser responsáveis pelo surgimento de resistência bacteriana nos animais, e que, posteriormente podem ser transmitidas através de material genético para outras bactérias e assim colonizar os seres humanos (CERQUEIRA, 2013).

Visto que há relação entre a resistência bacteriana em animais e humanos e que existe a necessidade de ações - não apenas focado na saúde humana, mas em toda a cadeia de transmissão da resistência antimicrobiana - no início dos anos 2000 a Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) abordaram o tema “Saúde Única” no Plano de Ação Global para o Enfrentamento à Resistência aos Antimicrobianos (ESTRELA, 2018).

Saúde Única (em inglês, *One Health*), estabelece o envolvimento não apenas humano, mas também ambiental e animal na resistência aos antimicrobianos, tal como a necessidade de colaboração entre esses diferentes setores para a sua prevenção, vigilância e combate (ESTRELA, 2018). Esta abordagem, traz em voga questões que podem ser aprimoradas entre os diferentes setores, sejam eles saúde humana, saúde animal e ecossistemas, identificando formas de diminuir riscos e proporcionar uma visão mais ampla de como a saúde humana está intimamente ligada aos animais e ao meio ambiente (BERTHE, 2017).

Sendo assim, a proposta desse trabalho é investigar e determinar os microrganismos resistentes que colonizam pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC, provenientes de municípios do oeste do estado de Santa Catarina, onde se localizam as principais criações de suínos e aves do estado, possibilitando o estudo da dinâmica desses microrganismos entre o meio hospitalar e o de criação animal.

2 OBJETIVOS

Isolar e identificar bactérias resistentes aos antimicrobianos em amostras de pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC oriundos de cidades do oeste do estado de Santa Catarina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Processar amostras de *swab* nasal, de leite e de fezes (ou *swab* retal) coletados de pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC oriundos de cidades do oeste de Santa Catarina para o isolamento de bactérias resistentes aos antimicrobianos;
2. Selecionar e identificar fenotipicamente as colônias obtidas no cultivo primário;
3. Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados aos principais antimicrobianos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana é vista como um processo natural dos microrganismos que vem sendo observada a partir da descoberta do primeiro antimicrobiano. Porém, o uso inadequado e prolongado de antimicrobianos no tratamento de infecções e como promotores de crescimento na criação animal vem acelerando esse processo (O' NEILL, 2016).

Infecções causadas por microrganismos resistentes causam sérios problemas nos sistemas de saúde por aumentarem as taxas de mortalidade, o tempo de hospitalização e os custos do tratamento, além de restringirem o arsenal de medicamentos eficazes que também é intensificado pelo reduzido número de novos antimicrobianos introduzidos no mercado nos últimos anos (BASSETI, 2015; WRIGHT, 2005).

Os microrganismos que apresentam resistência aos antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o Centro Europeu de Controle de Doenças (ECDC) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), em MDR (resistente a multidrogas) que é definida como a resistência a um agente antimicrobiano em três ou mais categorias de antimicrobianos, XDR (extensivamente resistente aos antimicrobianos) como a resistência a pelo menos um agente em todas, exceto em duas ou menos categorias de antimicrobianos e PDR (pan droga resistente) como a resistência a todos os agentes de todas as categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS, 2012).

Bactérias MDR estão entre as principais causadoras de infecções graves, sobretudo no ambiente hospitalar, sendo que a resistência bacteriana pode ser classificada em resistência intrínseca e resistência adquirida, seja por mutação ou por transmissão de material genético (BASSETI, 2015).

A resistência intrínseca é conhecida como a resistência aos antimicrobianos que algumas bactérias já possuem naturalmente, sem terem tido contato anteriormente com algum destes medicamentos e acontece, principalmente, pela presença de enzimas que são capazes de inativar o antimicrobiano, pela ausência de alvo do medicamento ou por especificidades próprias das bactérias, como expressão de bombas de efluxo específicas (DZIDIC, 2008).

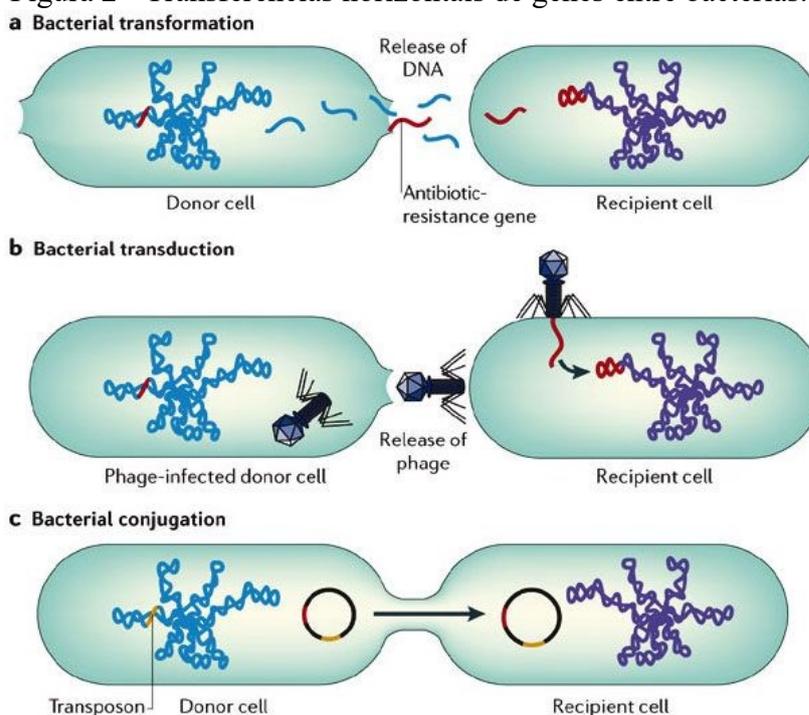
Em contrapartida, a resistência adquirida acontece quando a bactéria adquire resistência aos antimicrobianos devido a mutações em determinado local do cromossomo, ou

por transferência horizontal através da transferência de um gene de resistência de uma bactéria ou do meio que a circunda, para outra bactéria (DZIDIC, 2008).

Os genes responsáveis pela resistência a determinado antibacteriano podem estar localizados em plasmídeos, que são moléculas de DNA circular extracromossomal, ou seja, possuem a capacidade de se replicar de forma independente e dispõem de informações genéticas com alguma atividade específica, mas que não é estritamente necessária à sobrevivência da bactéria, e desse modo, pode ser transferida para outras bactérias. Essa aquisição horizontal do material genético mediada por plasmídeos é denominada de conjugação (DZIDIC, 2008; MAYER, 2010).

A aquisição de material genético também pode ocorrer por transformação, transdução e transposição. A transmissão horizontal por transformação acontece quando a bactéria adquire parte do DNA de outra bactéria que sofreu lise e que estava no meio que a circunda. A transmissão por transdução é mediada por bacteriófagos, com proteínas que protegem o material genético de enzimas presentes no meio, e que transportam no seu interior pedaços de DNA da bactéria doadora, para a receptora, fazendo com que assim, o material genético da outra bactéria se integre ao material genético da bactéria receptora (Figura 2). Já a transposição acontece devido aos elementos genéticos móveis que se movem de uma posição para outra no genoma (ANVISA, 2007; DZIDIC, 2008; DEPARDIEU, 2007; O'NEILL, 2016).

Figura 2 - Transferências horizontais de genes entre bactérias.



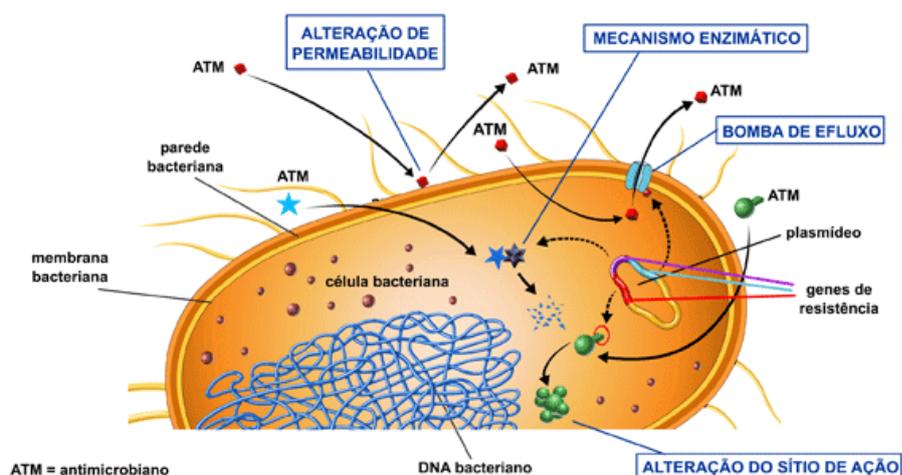
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Furuya, 2006.

Outra maneira de adquirir genes de resistência é através das mutações, que podem ocorrer de forma natural, durante a replicação, ou de forma induzida, através de radiações ultravioleta ou reações com espécies reativas de oxigênio (ROS), por exemplo.

Os genes de resistência, intrínsecos, adquiridos ou mutados, codificam mecanismos principais através dos quais as bactérias se tornam resistentes aos antimicrobianos, que são: alteração da permeabilidade celular, bombas de efluxo, que ejetam as substâncias para fora da célula bacteriana, alteração do local de ação do antimicrobiano e mecanismos que alteram a estrutura química do antimicrobiano, fazendo com que ele não consiga mais se ligar ao seu alvo e realizar o efeito desejado (Figura 3) (ANVISA, 2007; DZIDIC, 2008; DEPARDIEU, 2007; O'NEILL, 2016).

Figura 3 - Mecanismos gerais de resistência bacteriana aos antimicrobianos.



Fonte: Anvisa, 2007.

3.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Durante os últimos anos, a necessidade de combater os microrganismos multirresistentes (MDR) concentram-se principalmente nas bactérias Gram-negativas, e se intensificaram devido a declaração da OMS, que priorizou um grupo de bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas bactérias da ordem *Enterobacterales*) que possuem classificação crítica no que se refere à resistência aos antimicrobianos. Tais infecções causadas por bactérias Gram-negativas (BGN) necessitam de maior cuidado e preocupação, já que o arsenal de antimicrobianos para combatê-las não acompanha suas altas taxas de morbimortalidade (OMS, 2019; THEURETZBACHER, 2017). Dentre estas bactérias, pode-se destacar a ordem *Enterobacterales*, que engloba bactérias patogênicas como *Shigella* spp., e *Salmonella* spp., e bactérias que fazem parte da microbiota, mas que podem vir a causar infecções, como é o caso de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., também conhecidos como grupo KESK, além de *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morganii* (FARIÑAS, 2013).

O principal mecanismo de resistência dos BGN é a produção de β -lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico de antimicrobianos, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos.

Porém, há pelo menos três mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, como a alteração do sítio de ligação, através das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que ocorrem principalmente em cocos Gram-positivos; alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana, através da redução da expressão dos canais de porinas, locais por onde penetram os β -lactâmicos, e a degradação de antimicrobianos com anel β -lactâmico pela produção de β -lactamases (ANVISA, 2007; GISKE, 2008). Em relação às β -lactamases, existem diferentes classificações (Figura 4), porém a mais aceita e utilizada é a classificação de Bush & Jacoby (BUSH, JACOBY, 2010).

Figura 4 - Classificação das β -lactamases.

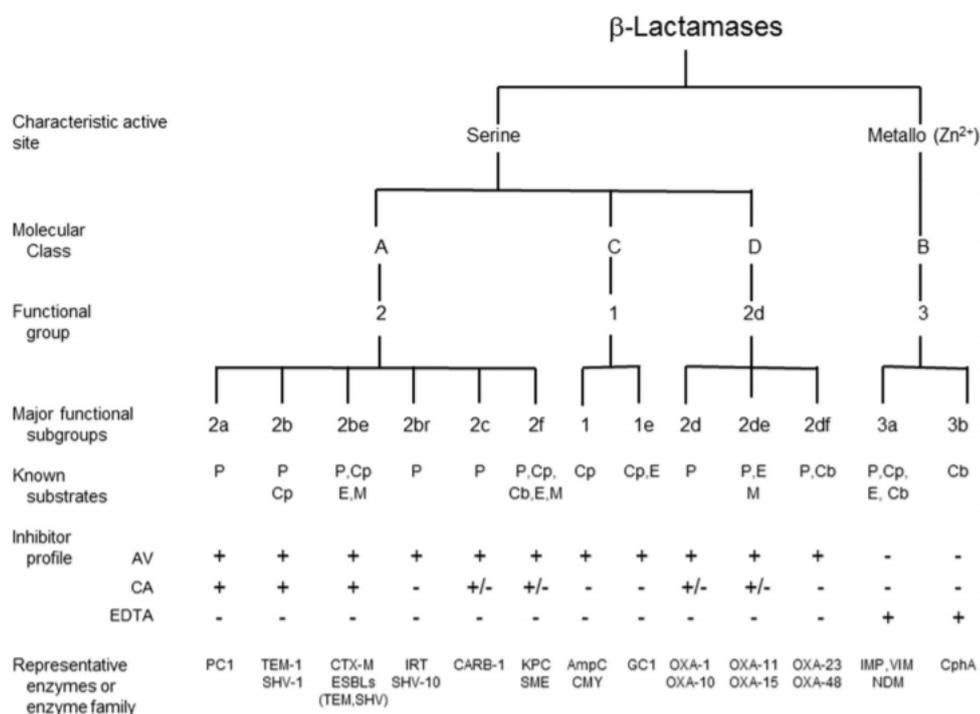


FIG 1 Molecular and functional relationships among β -lactamases (adapted from references 20 and 201 with permission). AV, avibactam; CA, clavulanic acid; Cb, carbapenem; Cp, cephalosporin; E, expanded-spectrum cephalosporin; M, monobactam; P, penicillin.

Relações moleculares e funcionais entre beta-lactamases. AV (avibactam), CA (ácido clavulânico) Cb (Carbapenêmicos), Cp (cefalosporinas), E (cefalosporinas de espectro estendido), M (monobactam), P (Penicilina)

Fonte: Bush, 2018.

Os principais grupos dessa classificação estão relacionados à classificação molecular e de grupos funcionais, que inclui as cefalosporinas do grupo 1 (classe C) onde engloba as cefalosporinas, codificadas pelo gene AmpC; as serino β -lactamases e carbapenemases de amplo espectro do grupo 2 (classes A e D) e as metalo- β -lactamases do grupo 3. No grupo das

serino β -lactamases (Classes A, C e D) estão incluídas as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que são enzimas que conseguem hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de terceira e quarta geração; carbapenemases do tipo KPC e oxacilinases. Em contrapartida, no grupo das metalo- β -lactamases estão incluídas as enzimas que hidrolisam carbapenêmicos e cefalosporinas, mas que possuem um zinco no sítio ativo (ANVISA, 2007; BUSH, JACOBY, 2010).

3.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

Simultaneamente ao aumento do perfil MDR em bactérias Gram-negativas, as infecções por bactérias Gram-positivas MDR também aumentaram e vêm causando preocupações. Bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) são as mais preocupantes e comuns (GISKE, 2008).

Enterococcus spp. é um gênero de bactérias oportunistas e Gram-positivas que podem causar infecções em humanos e que possuem resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, como cefalosporinas, sulfametoxazol/trimetoprim e clindamicina (ANVISA, 2007; TORTORA, 2012; YANGZOM, 2019). Desta forma, a vancomicina foi amplamente utilizada para o tratamento de enterococos, até que microrganismos resistentes apareceram, inicialmente na França em 1986 e logo em seguida, foram encontradas cepas de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) nos Estados Unidos. A expressão dos genes de resistência (os principais são: *vanA*, *vanB* e *vanC*) levam à síntese de precursores de peptidoglicanos, principal componente da parede celular, com diferentes terminações de aminoácidos levando à diminuição da afinidade do alvo pela vancomicina. Os genes estão presentes em elementos genéticos móveis e podem ser adquiridos por outras espécies, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (ANVISA, 2007; TORTORA, 2012; YANGZOM, 2019).

A resistência de infecções estafilocócicas ao tratamento com penicilina surgiu logo após seu advento. Em seguida a penicilina semissintética, meticilina começou a ser utilizada para as infecções, mas também, pouco tempo depois, apareceram cepas resistentes e os microrganismos foram chamados *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Esta

resistência se tornou tão prevalente que o uso de meticilina foi descontinuado (GISKE, 2008; TORTORA, 2012).

S. aureus tornou-se resistente à meticilina devido a aquisição do gene *mecA* ou *mecC*. Tais genes são transportados pelo cromossomo “*staphylococcal cassette chromosome mec*” (SCCmec), provavelmente adquirido por transferência horizontal de estafilococos coagulase negativa (WU, 2019).

Com o surgimento de cepas resistentes à meticilina, a classe dos glicopeptídeos passou a ser amplamente utilizadas para o tratamento, onde o principal representante é a vancomicina. Como o uso deste antimicrobiano foi considerado o principal para o tratamento de MRSA, não é surpresa que começaram a aparecer cepas resistentes à vancomicina, que ficaram conhecidas como *Staphylococcus aureus* com heteroresistência à vancomicina (hVISA) e *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA). Acredita-se que o mecanismo de resistência intermediária aos glicopeptídeos (vancomicina) se deve à um espessamento da membrana celular da bactéria, dificultando a penetração do antimicrobiano (ANVISA, 2007; TORTORA, 2012; YANGZOM, 2019).

Outro fenótipo de resistência do *S. aureus* é conhecido como *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA). Este mecanismo de resistência apareceu devido à aquisição do gene *van*, através de elementos genéticos móveis, dos *Enterococcus*. (ANVISA, 2007; TORTORA, 2012; YANGZOM, 2019).

O grande grupo dos estafilococos coagulase negativa podem apresentar os mesmos mecanismos de resistência encontrados em *S. aureus*. Essas bactérias normalmente causam infecções de pele, mas podem causar sérias infecções em pacientes imunocomprometidos, os quais também podem possuir resistência às penicilinas, e que conseqüentemente podem levar ao uso de antimicrobianos alternativos, como a vancomicina (PEREIRA, 2020).

Durante muito tempo, a vancomicina e a avoparcina foram utilizados como promotores de crescimento animal na Europa, até que em 1996 o uso veterinário foi proibido na Alemanha. Algum tempo depois, foi verificado que amostras positivas para VRE diminuíram de 100% para 25%, bem como, houve diminuição no número de infecções causadas por VRE (ANVISA, 2007; TORTORA, 2012; YANGZOM, 2019).

Assim sendo, o surgimento de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo a vancomicina, deixa poucas possibilidades de tratamento para infecções causadas por bactérias MDR e causa alerta aos sistemas de saúde. Para resolver esse

problema, é necessário legitimar o envolvimento multissetorial na questão da resistência bacteriana.

3.4 INFLUÊNCIA DA CRIAÇÃO ANIMAL NA DISSEMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são utilizados na criação animal para diferentes fins, para tratamento, profilaxia, metafilaxia ou promotores de crescimento (INNES, 2020). O uso para tratamento está intimamente ligado ao tratamento de doenças infecciosas que é realizado após a identificação do agente causador da doença e teste de sensibilidade antimicrobiana. Porém é comum o uso de antimicrobianos como profilaxia, onde o antimicrobiano é utilizado nos animais antes da doença aparecer, já que muitas infecções podem ser comuns em diferentes rebanhos de animais, como por exemplo a pneumonia em bovinos causada pelo confinamento. Outra prática não muito difundida é a metafilaxia, esse método é utilizado para tratamento antimicrobiano do rebanho inteiro logo após o surgimento de infecção nos primeiros animais (PALMA, 2020).

Já a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento é feita através da administração de doses subterapêuticas por um período prolongado. Estudos mostram que o uso de doses subterapêuticas de antimicrobianos não somente selecionam bactérias resistentes (PALMA, 2020), mas também aumentam a taxa de variação genética e fenotípica, aumentando assim a evolução adaptativa. Os antimicrobianos também atuam como moléculas sinalizadoras que podem influenciar atividades fisiológicas como expressão de fatores de virulência e formação de biofilmes (ANDERSSON, 2014). A fim de frear esse problema, muitos países proibiram o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, como por exemplo, a União Europeia que decretou a proibição em 2006, com consequente diminuição do predomínio de microrganismos resistentes (PALMA, 2020; INNES, 2020).

3.5 SAÚDE ÚNICA

No mundo todo, criações de gado, aves e suínos são fontes de alimento e renda para milhares de pessoas. Porém, associado ao grande consumo, há a demanda cada vez maior desses produtos e consequentemente o aumento do uso de antimicrobianos, não só para tratamento de

animais doentes, mas como fatores de crescimento. Todo esse processo está associado ao aumento da resistência antimicrobiana (QUIMERA, 2020).

Além da resistência antimicrobiana associada à criação animal, a contaminação dos solos, águas e plantas estão associadas ao aumento de microrganismos resistentes (QUIMERA, 2020). Todas as múltiplas relações entre estes e os diferentes ecossistemas auxiliam a troca de genes e possivelmente expandem os microrganismos resistentes, tornando assim um grave problema global (PALMA, 2020).

Atualmente o termo “Saúde Única” (*One Health*) vem sendo abordado no mundo como um modo efetivo de combater os problemas de saúde, principalmente a resistência antimicrobiana, que envolvem as esferas humana-animal-ambiental (CDC, 2018). Assim, há a colaboração entre esses diferentes setores afim de promover saúde ampla para pessoas, animais e ambiente (PALMA, 2020).

No setor animal, a saúde única busca reduzir o uso e tratamentos desnecessários em animais, reduzindo assim a pressão seletiva nos microrganismos. No setor humano, as principais abordagens da saúde única se concentram na diminuição e conscientização do uso de antimicrobianos sem necessidade, bem como a diminuição de numerosas prescrições. Já no setor ambiental, há a busca pela diminuição do despejo de resíduos industriais, principalmente das indústrias farmacêuticas, agrícolas e civis a fim de diminuir a propagação de microrganismos resistentes (PALMA, 2020).

4 JUSTIFICATIVA

O uso indevido de antimicrobianos em pessoas e o uso excessivo em animais promovem o surgimento e a seleção de bactérias multirresistentes, com impacto negativo nos sistemas de saúde (INNES, 2020). A circulação de pessoas e animais entre diferentes partes do mundo é um importante meio de dispersão desses microrganismos multirresistentes, os quais causam sérios problemas no tratamento de infecções, principalmente em hospitais, além de gerarem altos custos aos sistemas de saúde (WRIGHT, 2005).

Segundo pesquisa do Painel de Despesas Médicas da Agência dos Estados Unidos (EUA) para Pesquisa e Qualidade em Saúde (AHRQ), 1,2 milhões de infecções por bactérias MDR foram contabilizadas por ano durante os anos de 2002 a 2014 e estima-se que mais de 2 milhões de infecções por bactérias MDR e 23 mil mortes foram registradas anualmente nos EUA, segundo dados de 2011 (INNES, 2020).

Levando em consideração todos esses números alarmantes, deve-se mencionar o impacto econômico devido aos microrganismos multirresistentes. Estima-se que os Estados Unidos gastem por ano US \$ 55 bilhões com resistência antimicrobiana (SMITH & COAST, 2013).

Muitos antimicrobianos que são utilizados nos alimentos dos animais também são utilizados para tratar doenças em humanos. Um exemplo é a colistina, que era amplamente utilizada na agricultura na China, e se acredita que o seu uso favoreceu o aparecimento e disseminação do gene de resistência *mcr-1* em frangos e porcos, e que depois se espalhou para diferentes países. A posterior suspensão do uso desse antimicrobiano na criação animal fez com que diminuíssem o número de casos de infecções causadas por bactérias MDR, o que sugere relação direta do uso de antimicrobianos em animais e humanos com aparecimento de microrganismos resistentes (INNES, 2020). Visto que a região oeste do estado de Santa Catarina é reconhecida como a maior produtora nacional de suínos e segunda maior de aves, e que são utilizados antimicrobianos para criação destes animais, é importante a avaliação da colonização por bactérias resistentes de pacientes provenientes dessa região.

5 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) e fez parte de um projeto maior intitulado “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal” aprovado pela Fundação Bill & Melinda Gates e pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (CAA: 10282619.5.0000.0121). A seguir, estão descritas todas as metodologias que foram realizadas.

5.1 RECRUTAMENTO E AMOSTRAGEM

Foram convidados a participar da pesquisa indivíduos adultos, de ambos sexos, atendidos no hospital por motivo de internação e que provinham dos municípios do oeste de Santa Catarina, locais aonde estão localizadas a maioria das criações de suínos e aves do estado. Após a introdução do projeto, os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, TCLE (Anexo 1).

Para a coleta, os indivíduos participantes do estudo receberam as indicações necessárias da equipe de enfermagem para a obtenção da amostra de fezes de forma adequada, empregando frascos para coprocultura. Os *swabs* nasais foram coletados por uma enfermeira participante da equipe do projeto. Foi coletada uma amostra de *swab* retal quando o paciente estava impossibilitado de coletar as fezes e os *swabs* de leite foram coletados por um integrante da equipe do projeto.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os participantes com doença terminal, doença psiquiátrica, internados na UTI (Unidade de Tratamento Intensivo), com mais de 48h de internação, visto que após 48h de internação o aparecimento de bactérias nas amostras dos pacientes é considerado como bactéria adquirida em ambiente hospitalar, e/ou que a qualquer tempo desistam de sua participação.

5.3 COLETA DE AMOSTRAS

Entre agosto de 2019 e fevereiro de 2020 foram coletadas amostras de fezes (ou *swab* retal), *swab* nasal e *swab* de leito de 13 pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC, no máximo 48h após internação e antes da alta, totalizando 52 amostras, sendo duas amostras na internação (*swab* retal/fezes e *swab* nasal) e duas amostras na alta (*swab* retal/fezes e *swab* nasal), além de amostras posteriormente coletadas de *swab* de leito dos últimos 4 pacientes.

As amostras foram coletadas e levadas até o Laboratório de Microbiologia Aplicada (MIMA/UFSC), onde foram analisadas.

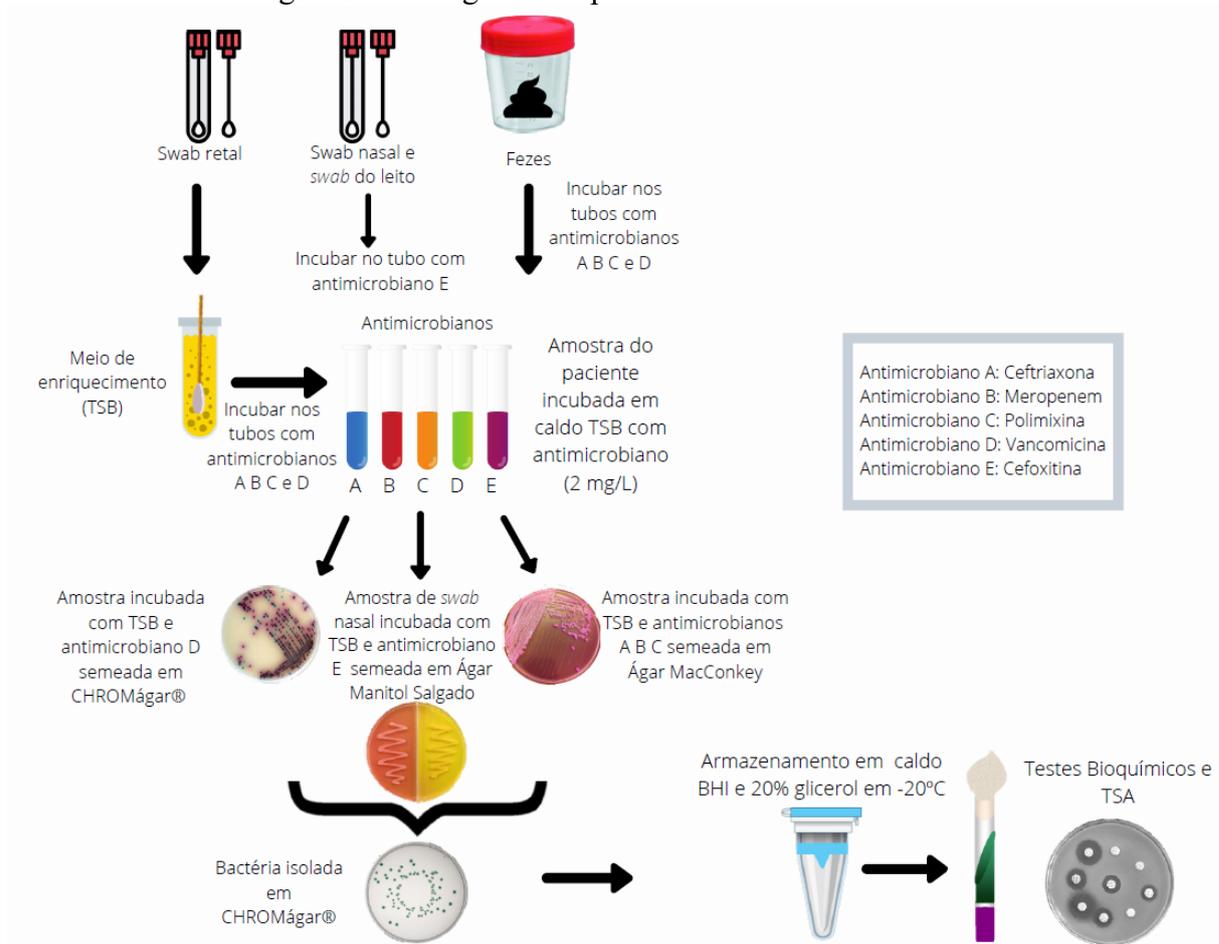
5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E SELEÇÃO DE ISOLADOS

Após recebimento das amostras, sendo elas *swab* retal ou fezes, *swab* nasal e *swab* do leito, foi feito o enriquecimento das amostras de *swab* retal, através da suspensão em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) incubado em estufa 35 ± 2 °C por 18-24 h. Para amostras de fezes, *swab* nasal e do leito o enriquecimento não se faz necessário já que há grande quantidade de amostra quando são coletadas as amostras de fezes, mesmo tendo grande número de bactérias neste meio, e os *swabs* nasais e de leito possuem quantidade menor de bactérias.

Para fazer a análise do presente estudo, optou-se por selecionar os microrganismos considerados multidroga resistentes. Para fazer essa seleção, foram utilizados tubos com 2 ml de TSB com 2 mg/L de antimicrobianos e 10 µl do caldo de enriquecimento do *swab* retal. No caso de fezes foi utilizado *swab* para coletar uma alíquota da amostra e depois o mesmo foi inoculado em caldo TSB com os antimicrobianos específicos. O mesmo foi realizado para *swab* nasal e do leito, porém a inoculação em caldo TSB foi feita apenas com a cefoxitina (2 mg/L). Os tubos foram identificados de acordo com o tipo de amostra e do antimicrobiano utilizado na seleção. Os antimicrobianos utilizados foram: ceftriaxona (antimicrobiano A) para selecionar BGN produtoras de ESBL, meropenem (antimicrobiano B), para selecionar BGN resistentes aos carbapenêmicos, polimixina B (antimicrobiano C) para selecionar BGN resistentes às polimixinas, vancomicina (antimicrobiano D) para seleção de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e cefoxitina (antimicrobiano E) para seleção de estafilococos resistentes à meticilina. Assim, cada tubo de TSB com antimicrobiano e amostra do paciente foram incubados em estufa por 18-24 h à 35 ± 2 °C.

Após a seleção em caldo, foi feito o isolamento em placas com meio de cultura, os quais foram, CHROMagar Orientation Chromogenic BD[®], ágar Manitol Salgado e ágar MacConkey (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma do processamento das amostras.



Legenda: TSB (*Tryptic Soy Broth*); TSA (Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos); BHI (*Brain Heart Infusion*).

Fonte: Própria autora.

5.4.1 Amostras de swab nasal e swab do leite

Para as amostras de swab nasal e de swab do leite, inoculadas em caldo TSB com cefoxitina, foi utilizado o ágar Manitol Salgado para fazer o isolamento, a fim de isolarmos os

estafilococos resistentes à meticilina, visto que o ágar manitol salgado é apropriado para isolamento seletivo de estafilococos e para a detecção de *Staphylococcus aureus*.

O ágar manitol na sua formulação contém o açúcar manitol. A fermentação deste acidifica o meio e resulta na alteração no indicador de pH vermelho de fenol, que ajuda na diferenciação das espécies de estafilococos. De maneira geral, os estafilococos coagulase positiva como o *S. aureus* produzem colônias amarelas e um meio amarelo circundante (Figura 6) (BD, 2013).

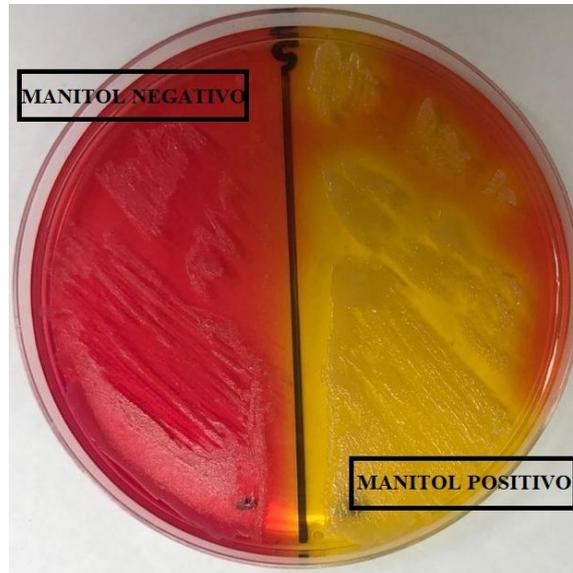
Após semeadura por esgotamento, a placa foi incubada de 18-24 h a 35 ± 2 °C e as diferentes colônias presentes nas placas, identificadas, sendo semeadas quantas vezes foram necessárias até obtenção de apenas um morfotipo colonial. Posteriormente as colônias foram semeadas em CHROMagar Orientation Chromogenic BD ® (Figura 7) para análise das características da colônia neste meio.

O CHROMagar Orientation Chromogenic BD ® é utilizado para isolamento e diferenciação de patógenos de acordo com as diferentes cores que apresenta de acordo com as colônias que são inoculadas. Este meio contém substratos cromogênicos específicos que são clivados por enzimas produzidas pelas bactérias (BD, 2019).

Após identificação presuntiva da bactéria, uma alçada da colônia foi transferida para um microtubo com caldo BHI e 20% de glicerol e congelada a -20°C.

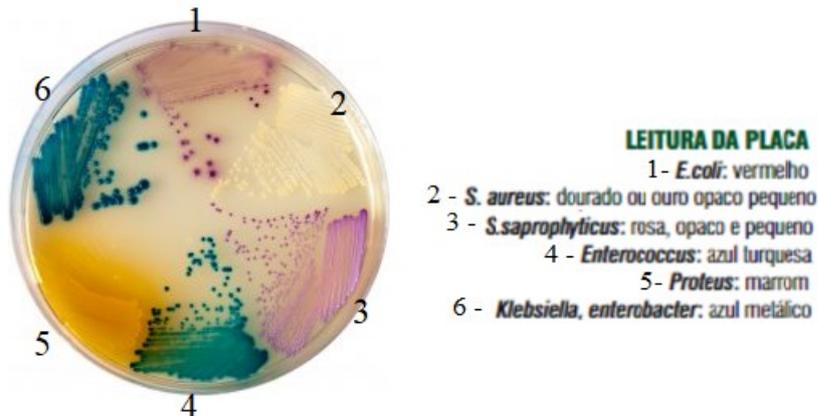
O *swab* do leito foi processado assim como o *swab* nasal pois foi considerada presente a microbiota das mãos nesta amostra, o que seria normalmente encontrado nos leitos dos pacientes, visto que profissionais de saúde, pacientes e acompanhantes colocam as mãos próximas ao leito, além disso considera-se a microbiota das mãos similar à microbiota nasal.

Figura 6 - Placa de ágar manitol salgado mostrando a alteração na coloração de vermelho para amarelo na presença de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Própria autora.

Figura 7 - Leitura da placa de CHROMagar Orientation Chromogenic BD®.



Fonte: Adaptado pela autora de CHROMagar

(http://www.chromagar.com/fichiers/1483453721LF_EXT_002_RT_V6.1_Siteweb.pdf?PHPSESSID=99d910fc899249d8004c92db0678295)

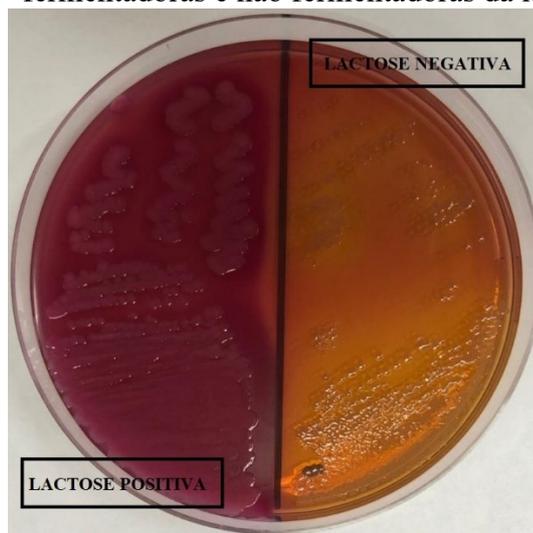
5.4.2 Amostras de *swab* retal ou amostra de fezes

Amostras provenientes de *swab* retal ou de fezes, após o procedimento de enriquecimento (no caso de amostras de *swab* retal) e seleção com os antibacterianos, foram semeadas em placas com ágar MacConkey, meio seletivo e diferencial para isolamento de bactérias Gram-negativas (Figura 8). Este meio de cultura contém a lactose como único açúcar

e o indicador de pH vermelho neutro e, por isto, permite a diferenciação das bactérias lactose positiva (fermentadoras de lactose que possuem colônias vermelhas/rosas, como por exemplo *E. coli*) das bactérias lactose negativa (não fermentadoras de lactose que formam colônias amarelas como *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas* por exemplo) (BD, 2014).

Após semear por esgotamento, as placas foram incubadas em estufa por 18-24 h a 35 ± 2 °C. Reisolamentos foram feitos até obter um único morfotipo bacteriano por placa. Posteriormente as colônias foram semeadas em CHROMagar Orientation Chromogenic BD® para análise das características da colônia neste meio. Após identificação presuntiva da bactéria, uma alçada da colônia foi transferida para um microtubo com caldo BHI e 20% de glicerol e congelada a -20 °C.

Figura 8 - Placa de ágar MacConkey, mostrando a diferença na coloração de bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.



Fonte: Própria autora.

5.5 TESTES BIOQUÍMICOS

De acordo com o crescimento em CHROMagar Orientation Chromogenic BD®, foi feita análise presuntiva da bactéria, e assim, os testes bioquímicos foram conduzidos através da suspeita, para confirmação e diferenciação das bactérias. (Quadro 1).

Quadro 1 - Testes bioquímicos utilizados para confirmação das bactérias

Enterobactérias	SCN	<i>S. aureus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp./ <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>
OF glicose	Catalase	Coagulase	OF glicose	Catalase	Citrato
Oxidase	Coagulase	Manitol salgado	Oxidase	NaCl	Indol
Lactose	Oxidase		Motilidade em BHI	Bea	
Sacarose	Manitol Salgado		Crescimento em BHI 37°C e 42°C	Arginina	
SIM	SIM		Citrato	SIM	
Citrato	Nacl		SIM	Arabinose	
Lisina	Uréia		Cetrimide	Sorbitol	
Ornitina	Bacitracina		OF Xilose	Manitol Salgado	
Arginina			OF Maltose	Sacarose	
VM			OF Sacarose		
VP					

Fonte: Própria autora

5.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado para todos os isolados da ordem Enterobacterales, por disco difusão, conduzidos de acordo com os procedimentos do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCast: www.brcast.org.br) (Quadro 2).

Em primeiro lugar, os isolados foram semeados em ágar seletivo e diferencial MacConkey para averiguar a sua pureza. Confirmada a pureza, foi realizada a semeadura em ágar Müller-Hinton, utilizando-se um *swab* de algodão estéril inoculado em uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao tubo 0,5 de McFarland. Após 5 min, usando uma pinça flambada, discos de antimicrobianos foram aplicados e a placa incubada à temperatura de 35±2°C em estufa por 18-24 h. Decorrido esse tempo foi realizada a medição dos halos de

inibição formados em torno dos respectivos antimicrobianos. A categorização dos resultados foi feita de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast (2019).

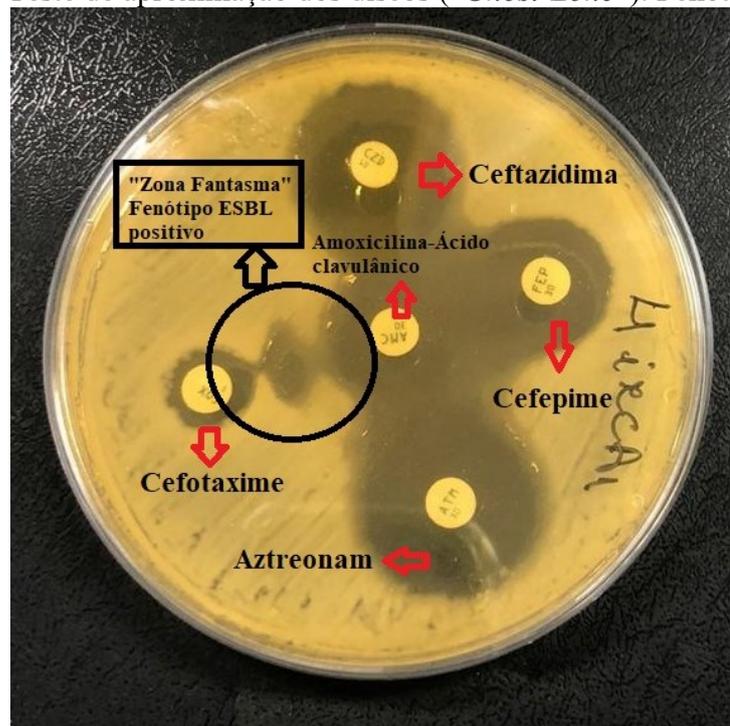
Quadro 2 - Antibacterianos que foram usados no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).

Antimicrobiano	Conteúdo do disco (µg)
Ampicilina	10
Ampicilina-sulbactam	10-10
Amoxicilina-ácido-clavulânico	20-10
Piperacilina-tazobactam	30-6
Cefalexina	30
Cefepima	30
Cefotaxima	5
Cefoxitina	30
Ceftadizima	10
Ceftriaxona	30
Cefuroxima	30
Ertapenem	10
Imipenem	10
Meropenem	10
Aztreonam	30
Ciprofoxacino	5
Levofloxacino	5
Ácido nalidíxico	30
Norfloxacino	10
Amicacina	30
Gentamicina	10
Tobramicina	10
Tigeciclina	15
Cloranfenicol	30
Fosfomicina	200
Nitrofurantoína	100
Sulfametoxazol-trimetoprima	23,75-1,25

Fonte: Própria autora.

Além do TSA para identificar as bactérias resistentes aos antimicrobianos utilizados, os discos também foram dispostos de forma a identificar mecanismos de resistência fenotípicos, como produção de ESBL através do processo de sinergismo (“*Ghost- Zone*”) com a aproximação dos discos de Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg e Cefalosporinas (Figura 9).

Figura 9 - Teste de aproximação dos discos (“*Ghost-Zone*”). Fenótipo ESBL.



Fonte: Própria autora.

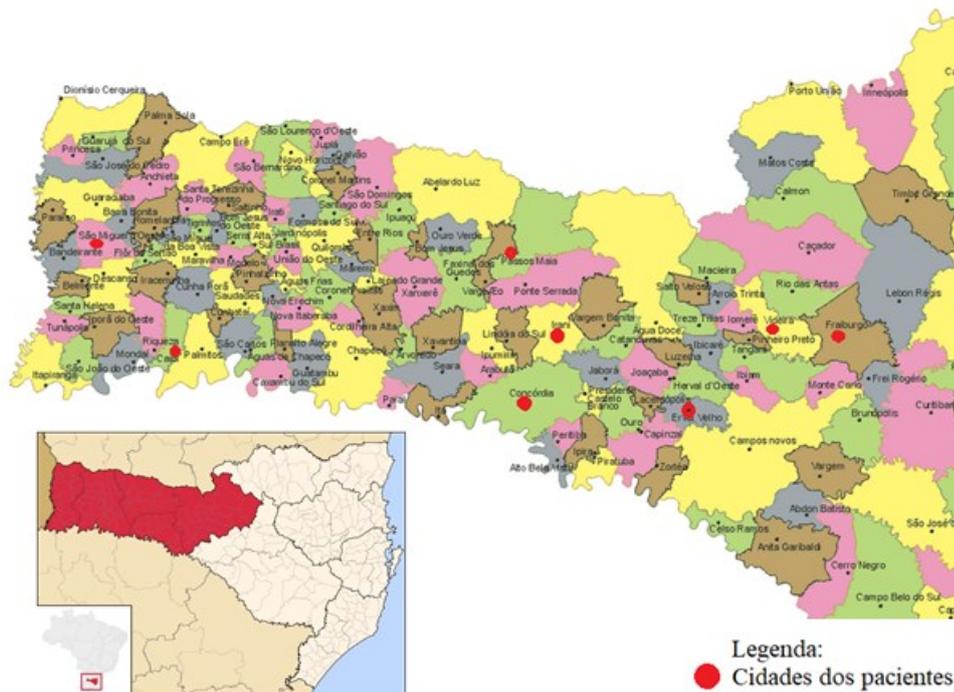
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES

Durante os meses de agosto de 2019 a fevereiro de 2020 foram coletadas 52 amostras de 13 pacientes internados no Hospital Universitário/ UFSC. Estas amostras foram processadas no Laboratório MIMA, onde após a seleção das bactérias resistentes, um total de 128 isolados foram obtidos, isso porque, foram isoladas mais de um tipo de bactéria resistente de uma única amostra.

Os pacientes que participaram da pesquisa são do oeste e meio-oeste de Santa Catarina, das cidades de: Caibí, Videira, São Miguel do Oeste, Erval Velho, Concórdia, Fraiburgo, Irani e Passos Maia (Figura 10).

Figura 10 - Cidades de residência dos pacientes no oeste e meio-oeste de Santa Catarina.



Fonte: Adaptado pela autora de Mapas Blog (<https://mapasblog.blogspot.com/2011/10/mapas-de-santa-catarina.html>).

Dos 13 pacientes, 9 (69,2%) são referentes a pacientes do sexo masculino e 4 (30,8%) referentes ao sexo feminino (Tabela 1). Com relação ao tempo de internação, variou de 2 a 43 dias, com uma média de 14,45 dias de internação ($\pm 11,63$ dias).

Tabela 1 - Variáveis relacionadas a sexo e tempo de internação dos pacientes.

Variáveis	N (%)
Sexo	
Masculino	9 (69,2%)
Feminino	4 (30,8%)
Tempo de internação (dias)	
0-15	8 (61,5%)
16-30	2 (15,4%)
31-45	1 (7,7%)
Não informado	2 (15,4%)

Fonte: Própria autora.

Os motivos de internação dos pacientes são variados: Tratamento para pênfico com infecção cutânea, esclerose sistêmica com infecção por *Mycobacterium* spp. (não tuberculosa), acidente automobilístico, infecção cutânea em membro superior esquerdo, POI de correção de eventração diafragmática recidivada, hiperplasia prostática benigna, lesão por pressão infectada em região sacral, realização de hepatectomia e colecistectomia, pois possuía hemangioma hepático e colelitíase, internação por ciclo de quimioterapia, pois possuía (óbito) neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas, abscesso hepático + coledocolitíase + colangite, neoplasia maligna de pulmão no lobo superior esquerdo e outros dois paciente não se sabe o motivo da internação pois não foi informado.

Em relação ao uso de antimicrobianos utilizados durante a internação (Tabela 2), 9 (69,2%) usaram, 2 (15,4%) não usaram e 2 (15,4%) não foram informados, sendo que a quantidade de antimicrobianos em uso variou de 0 a 7 e a média foi de 2,09 antimicrobianos por pessoa ($\pm 2,3$). Outro estudo feito em um hospital público de Fortaleza se assemelha ao resultado encontrado pois cerca de um terço dos pacientes hospitalizados e participantes do estudo faziam uso de antibióticos durante a internação (BARROS,2012). Tempo de uso incorreto, uso desnecessário e dosagens incorretas desses antimicrobianos podem piorar ainda mais a questão da resistência aos antimicrobianos.

Em geral, quando há a administração de antimicrobianos, principalmente os de amplo espectro, a microbiota do paciente é afetada através da pressão seletiva que o uso desses antimicrobianos causam, reduzindo de forma significativa a diversidade microbiana e aumentando o número de microrganismos resistentes. Este desequilíbrio da microbiota pode provocar também diminuição de processos metabólicos, de absorção de vitaminas, e aumento

da suscetibilidade a infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos (JERNBERG, 2010).

Tabela 2 - Relação do uso de antimicrobianos durante internação dos pacientes

Paciente	Antimicrobianos	Tempo de uso (dias)
1	Oxacilina	3
	Ciprofloxacino	7
2	Piperacilina/Tazobactam	1
	Amicacina	35
	Meropenem	7
	RIPE (Rifampicina + Isoniazida + Pirazinamida + Etambutol)	35
3	Cefazolina	1
4	Oxacilina	2
	Sulfametoxazol/Trimetoprim	7
5	Não fez uso	0
6	Não fez uso	0
7	Clindamicina	6
	Ceftriaxona	6
8	Cefazolina	1
9	Sulfametoxazol/Trimetoprim	20
	Cefepima	9
	Meropenem	5
	Polimixina	4
	Vancomicina	1
10	Ampicilina/Sulbactam	1
11	Cefazolina	1
12	Não informado	NA
13	Não informado	NA

RIPE – Tratamento para *Mycobacterium* spp. não tuberculosa ; NA – Não se aplica.

Fonte: Própria autora.

6.2 CARACTERÍSTICAS E DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

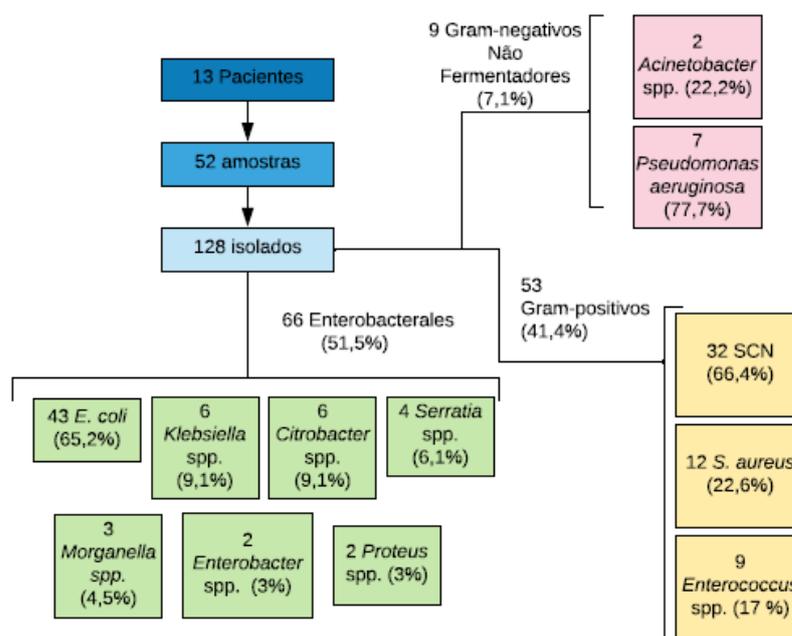
Dos 128 isolados obtidos, 66 (51,5%) pertencem a ordem Enterobacterales e dentre eles estão bactérias clinicamente importantes como *E. coli* 43 (65,2%), *Klebsiella* spp. 6 (9,1%), *Serratia* spp. 4 (6,1%), *Enterobacter* spp. 2 (3%) e *Proteus* spp. 2 (3%). Outras bactérias também foram identificadas, como *Citrobacter* spp. 6 (9,1%) e *Morganella* spp. 3 (4,5%). Além disso foram obtidos 9 (7,1%) isolados de bactérias Gram-negativas não fermentadoras da

glicose, dentre eles, *Pseudomonas aeruginosa* (7 isolados, 77,7%) e *Acinetobacter* spp. (2 isolados, 22,2%).

Outro grupo de bactérias encontradas nos isolados foram os cocos Gram-positivos, totalizando 53 amostras (41,4%), sendo eles *Staphylococcus* coagulase negativa 32 (66,4%), *S. aureus* 12 (22,6%) e *Enterococcus* spp. 9 (17%) (Figura 12).

Segundo dados epidemiológicos do HU/ UFSC, as bactérias Gram-negativas representam 62,2% dos microrganismos causadores de infecção hospitalar, sendo que *E. coli* e *K. pneumoniae* são as mais encontradas. Esses dados corroboram os encontrados no presente estudo, onde *E. coli* e *Klebsiella* spp. juntas representam sozinhas 74,3% dos isolados de enterobactérias obtidos, evidenciando a relação entre espécies colonizantes e causadoras de infecções (ZAMPARETTE,2019).

Figura 11 - Esquema de distribuição dos isolados bacterianos.

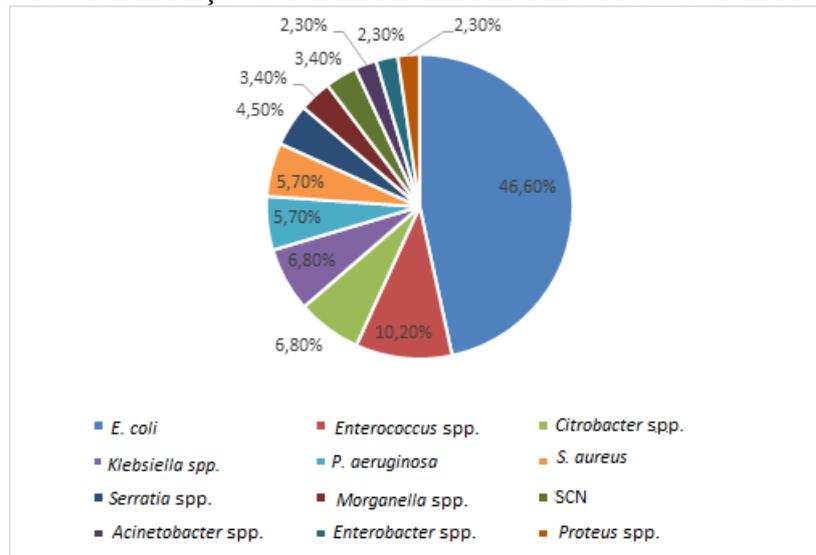


Fonte: Própria autora.

As amostras foram coletadas de *swab* nasal, *swab* retal ou fezes e *swab* do leite. Dentre todas, a que obteve maior número de isolados foram as de *swab* retal e fezes, cerca de 88 (68,7%) dos 128 isolados, sendo que os principais microrganismos isolados dessas amostras foram: 41 *E. coli* (46,6%), 9 *Enterococcus* spp. (10,2%), 6 *Citrobacter* spp. (6,8%), 6 *Klebsiella*

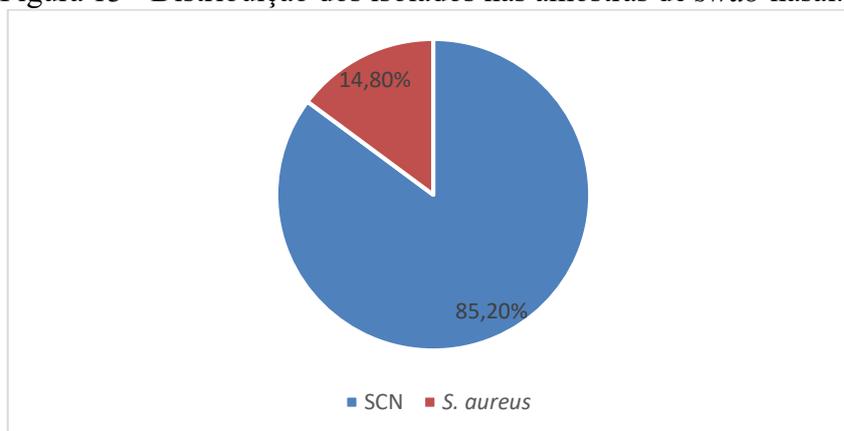
spp. (6,8%), 5 *Pseudomonas aeruginosa* (5,7%), 5 *Staphylococcus aureus* (5,7%), 4 *Serratia* spp. (4,5%), 3 *Morganella* spp. (3,4%), 3 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (3,4%), 2 *Acinetobacter* spp. (2,3%), 2 *Enterobacter* spp. (2,3%), 2 *Proteus* spp. (2,3%) (Figura 12). Tais dados demonstram a prevalência de *E. coli* e *Enterococcus* spp. nas amostras, o que era esperado já que essas bactérias são colonizantes do trato intestinal, bem como todas as outras enterobactérias citadas. Porém, bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., são patógenos oportunistas que estão normalmente no ambiente, como solos e podem colonizar pacientes imunocomprometidos ou até provocar infecções. Já bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus* são normalmente encontradas em maiores quantidades na pele e em vias aéreas, mas eventualmente podem colonizar outras partes do corpo, como o intestino.

Figura 12 - Distribuição dos isolados nas amostras de swab retal ou fezes.



Fonte: Própria autora.

Os isolados provenientes de swab nasal correspondem a 21,1% do total de isolados, ou seja, foram cerca de 27 isolados, dos quais, 23 (85,2%) identificados como SCN e 4 (14,8%) *S. aureus* (Figura 13).

Figura 13 - Distribuição dos isolados nas amostras de *swab* nasal.

Fonte: Própria autora.

Nos 4 últimos pacientes, além das amostras convencionalmente coletadas, amostras de *swab* do leito também foram processadas (Quadro 3). O paciente nº 10 na internação e na alta já era portador de um isolado de SCN no *swab* nasal, e SCN também foi encontrado no leito do paciente na alta. Nas amostras de *swab* do leito na alta do paciente nº 11 estava presente SCN, que também estava presente na amostra de *swab* nasal na internação, além de *S. aureus*, bactéria que não estava presente nas amostras de internação, mas estava presente na amostra de *swab* nasal na alta do paciente.

As amostras do leito do paciente nº 12 foram coletadas apenas na internação, onde após a seleção, cresceram bactérias como SCN e *S. aureus* que não estavam nas outras amostras de internação do paciente. Infelizmente a coleta da alta não pode ser realizada. É importante ressaltar a presença de *S. aureus* em amostras de *swab* do leito do paciente, sendo que esta bactéria não estava presente nas amostras de internação do mesmo.

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode ser encontrada facilmente na mucosa nasal e na pele de crianças e adultos. Porém, esse microrganismo pode alcançar outros sítios anatômicos facilmente, caso as barreiras de pele e mucosa estejam comprometidas, podendo causar infecção, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Essa bactéria tem grande capacidade de provocar diferentes infecções, desde as mais simples, até mais graves em nível sistêmico por ter alta capacidade de colonização, patogenicidade e virulência. Além disso, tem a capacidade de produzir toxinas e enzimas, induzindo de diferentes formas a resposta imune do paciente. Sendo assim, essa bactéria é de grande importância dentro da unidade hospitalar, visto que a grande maioria dos pacientes internados estão com a imunidade comprometida (SANTOS, 2007).

Já nas amostras do leito do paciente nº 13, na internação apareceram 2 bactérias: um isolado de SCN, que estava presente nas amostras de internação do paciente e *S. aureus*, que não foi encontrada nas amostras de internação e alta. No leito do paciente na alta também continuava presente o isolado de SCN. Estes dados demonstram que pode estar havendo problemas na higienização dos leitos e provavelmente há o carreamento dessas bactérias resistentes por toda a unidade de internação, visto que grande parte dos patógenos que foram encontrados nos leitos dos pacientes podem ficar nas superfícies por semanas ou meses. Dessa forma, a desinfecção correta das superfícies próximas aos pacientes é fator importante para que diminua a aquisição e transmissão dos microrganismos no ambiente hospitalar (KRAMER, 2006).

Quadro 3 - Isolados das amostras dos pacientes 10, 11, 12 e 13 que continham amostras de swab do leito.

Paciente	Amostra	Internação/ Alta/Leito	Isolado identificado
10if A1	Fezes	Internação	<i>E. coli</i> resistente à ceftriaxona (2 mg/L)
10if A2	Fezes	Internação	<i>Acinetobacter</i> spp. resistente à ceftriaxona (2 mg/L)
10if A3	Fezes	Internação	<i>Citrobacter</i> spp. resistente à ceftriaxona (2 mg/L)
10if B1	Fezes	Internação	<i>Klebsiella</i> spp. resistente à meropenem (2 mg/L)
10if B2	Fezes	Internação	<i>E. coli</i> resistente à meropenem (2 mg/L)
10if B3	Fezes	Internação	<i>Citrobacter</i> spp. resistente à meropenem (2 mg/L)
10if C1	Fezes	Internação	<i>Acinetobacter</i> spp. resistente à polimixina (2 mg/L)
10if C2	Fezes	Internação	<i>E. coli</i> resistente à polimixina (2 mg/L)
10if C3	Fezes	Internação	<i>Citrobacter</i> spp. resistente à polimixina (2 mg/L)
10in E1	Nasal	Internação	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
10an E1	Nasal	Alta	<i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
10an E3	Nasal	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
10al E1	Leito	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
11if A1	Fezes	Internação	<i>E. coli</i> resistente à ceftriaxona (2 mg/L)
11if D	Fezes	Internação	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina (2 mg/L)
11in E1	Nasal	Internação	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
11al E1	Leito	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
11al E2	Leito	Alta	<i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
11an E	Nasal	Alta	<i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
12in E1	Nasal	Internação	<i>E. coli</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
12in E2	Nasal	Internação	<i>E. coli</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
12ir B	Retal	Internação	<i>E. coli</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
12il E1	Leito	Internação	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
12il E2	Leito	Internação	<i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13in E	Nasal	Internação	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13ir D	Retal	Internação	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina (2 mg/L)
13il E1	Leito	Internação	<i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13il E2	Leito	Internação	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13ar A	Retal	Alta	<i>E. coli</i> resistente à ceftriaxona (2 mg/L)
13ar C	Retal	Alta	<i>E. coli</i> resistente à polimixina (2 mg/L)
13ar D	Retal	Alta	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina (2 mg/L)
13an E	Nasal	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13al E1	Leito	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)
13al E2	Leito	Alta	SCN resistente à cefoxitina (2 mg/L)

Legenda: i- internação; a- alta; r- retal; f- fezes; n- nasal; l- leito.

A: Ceftriaxona (2 mg/L) B: Meropenem (2 mg/L); C: Polimixina B (2 mg/L), D: Vancomicina (2 mg/L), E: Cefoxitina (2 mg/L)

Fonte: Própria autora.

Em relação às amostras obtidas na internação e na alta, os pacientes já vinham para o hospital com pelo menos 4 bactérias resistentes e a maioria deles adquiria alguma bactéria resistente no hospital, detectada nas amostras da alta (Quadro 4). Isso demonstra que os pacientes já vieram das suas cidades portando determinadas bactérias resistentes e que bactérias resistentes foram adquiridas no ambiente hospitalar. Outro trabalho mostrou que 60% dos pacientes foram colonizados ou infectados no ambiente hospitalar e que 40% dos pacientes estudados já chegaram no hospital com a presença de bactérias resistentes. Dessa maneira, a grande transmissão em todos os ambientes, hospitalar, na comunidade ou na criação animal por exemplo, pode explicar o aparecimento de bactérias resistentes em pacientes no momento da internação (GAVRONSKI, 2017).

O paciente que mais chamou a atenção foi o paciente número 8 que adquiriu 7 bactérias resistentes na alta, dentre elas: *Enterobacter* spp. resistente à ceftriaxona, *Serratia* spp. resistente à ceftriaxona, *E. coli* resistente à meropenem, *Citrobacter* spp. resistente à meropenem e polimixina, *P. aeruginosa* resistente à meropenem, *Klebsiella* spp. resistente à polimixina e *Klebsiella* spp. resistente à polimixina com características de hipervirulência por ter uma consistência “pegajosa”.

Quadro 4 - Bactérias isoladas nas amostras de internação e alta a partir da seleção com os antimicrobianos

	Isolados bacterianos obtidos após seleção com antimicrobianos na internação / alta (n/n)											
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	SCN	<i>Morganella spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
Antimicrobianos (2 µg/ml)												
Ceftriaxona	12/9	2/0	1/0	0/0	1/0	0/0	1/0	1/1	1/0	0/1	1/1	1/0
Meropenem	4/2	2/1	0/0	0/0	2/1	0/0	1/0	0/0	1/1	1/0	1/1	0/0
Polimixina	12/2	0/1	1/0	0/0	1/2	0/0	1/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/0
Vancomicina	0/0	0/0	0/0	6/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Cefoxitina	3/0	0/0	0/0	0/0	0/0	15/18	0/0	0/0	3/3	0/0	0/0	0/0

Fonte: Própria autora.

Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (continua)

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	Penicilinas				Cefalosporinas								Carbapenêmicos			Monobactâmicos	Fluoroquinolonas			Aminoglicosídeos				Tetraciclina	Agentes diversos	
		Ampicilina (10 µg)	Ampicilina-sulbactam (10-10 µg)	Amoxicilina-ácido clavulânico (20-10µg)	Piperacilina-Tazobactam (30-6µg)	Cefalexina (30 µg)	Cefepime (30 µg)	Cefotaxima (5 µg)	Cefoxitina (5 µg)	Ceftazidima (10µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Cefuroxima (30 µg)	Ertapenem (10 µg)	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Aztreonam (30 µg)	Ciprofloxacino (5 µg)	Levofloxacino (5 µg)	Norfloxacino (10 µg)	Amicacina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Tobramicina (10 µg)	Tigeciclina (15 µg)	Fosfomicina (200 µg)	Nitrofurantoina (100 µg)	Sulfametoxazol-trimetoprima (23, 75/1, 25/ µg)	
3	3if A4 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3	3if B1 (MG)	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
3	3if B2 (EC)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	I	I	R	S	S	S	S	S	
3	3if C1 (MG)	R	S	R	S	R	S	I	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S		
3	3if C2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S		
3	3if C3 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4	4ir A1*# (EC)	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	I	S	I	R	I	S	I	I	I	S	S	S	S	
4	4ir C1 (ST)	R	R	R	I	R	S	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
4	4ar A1*# (EC)	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	R	
4	4ar A2*# (EC)	R	R	R	S	R	R	R	S	I	R	R	S	S	S	I	R	R	R	S	I	I	S	S	S	S	
4	4ar C1 (ST)	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R		S	S	S	S	S	
4	4ir C2 (EC)	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
5	5if C1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	S	S	R	S		
5	5if C2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I	S	S	R	S		
6	6if B1 (EC)	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	

Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos

(continua)

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	Penicilinas				Cefalosporinas								Carbapenêmicos			Monobactâmicos	Fluoroquinolonas			Aminoglicosídeos				Tetraciclina	Agentes diversos	
		Ampicilina (10 µg)	Ampicilina-sulbactam (10-10 µg)	Amoxicilina-ácido clavulânico (20-10µg)	Piperacilina-Tazobactam (30-6µg)	Cefalexina (30 µg)	Cefepime (30 µg)	Cefotaxima (5 µg)	Cefoxitina (5 µg)	Ceftazidima (10µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Cefuroxima (30 µg)	Ertapenem (10 µg)	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Aztreonam (30 µg)	Ciprofloxacino (5 µg)	Levofloxacino (5 µg)	Norfloxacino (10 µg)	Amicacina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Tobramicina (10 µg)	Tigeciclina (15 µg)	Fosfomicina (200 µg)	Nitrofurantoina (100 µg)	Sulfametoxazol-trimetoprima (23, 75/1, 25/ µg)	
6	6if C1 (EC)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	I	R	S	S	S	R		
6	6if C2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S		
7	7ir A1*# (EC)	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	
7	7ir A3*# (EC)	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	
7	7ar A1# (EC)	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	
7	7ar A2*# (EC)	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	
7	7ar A3*# (EC)	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	
7	7ar B2* (EC)	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	I	S	R	S	R	
8	8if A1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S		
8	8if A2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
8	8if B1 (ST)	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
8	8if C1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
8	8if C2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
8	8af A1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
8	8af A2 (EB)	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S		

Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (continua)

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	Penicilinas				Cefalosporinas								Carbapenêmicos			Monobactâmicos	Fluoroquinolonas			Aminoglicosídeos				Tetracilinas	Agentes diversos	
		Ampicilina (10 µg)	Ampicilina-sulbactam (10-10 µg)	Amoxicilina-ácido clavulânico (20-10µg)	Piperacilina-Tazobactam (30-6µg)	Cefalexina (30 µg)	Cefepime (30 µg)	Cefotaxima (5 µg)	Cefoxitina (5 µg)	Ceftadizima (10µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Cefuroxima (30 µg)	Ertapenem (10 µg)	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Aztreonam (30 µg)	Ciprofloxacino (5 µg)	Levofloxacino (5 µg)	Norfloxacino (10 µg)	Amicacina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Tobramicina (10 µg)	Tigeciclina (15 µg)	Fosfomicina (200 µg)	Nitrofurantoina (100 µg)	Sulfametoxazol-trimetoprima (23, 75/1, 25/ µg)	
8	8af A3 (ST)	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S		
8	8af B1 (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S		
8	8af B2 (CT)	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S		
8	8af C1 (KB)	S	S	R	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
8	8af C2 (CB)	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S		
8	8af C3 (KB)	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S		
9	9ir A (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R		
9	9ir B* (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R		
9	9ir C1 (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R		
9	9ir C2 (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R		
9	9ar A1 (CT)	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		
9	9ar A2* (EC)	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	R	R	S	S	R		
9	9ar C (EC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R		
10	10if A1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
10	10if A2* (AC)	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	R	R	S		

Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (conclusão)

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	Penicilinas				Cefalosporinas								Carbapenêmicos			Monobactâmicos	Fluoroquinolonas			Aminoglicosídeos				Tetraciclina	Agentes diversos								
		Ampicilina (10 µg)	Ampicilina-sulbactam (10-10 µg)	Amoxicilina-ácido clavulânico (20-10µg)	Piperacilina-Tazobactam (30-6µg)	Cefalexina (30 µg)	Cefepime (30 µg)	Cefotaxima (5 µg)	Cefoxitina (5 µg)	Ceftazidima (10µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Cefuroxima (30 µg)	Ertapenem (10 µg)	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Aztreonam (30 µg)	Ciprofloxacino (5 µg)	Levofloxacino (5 µg)	Norfloxacino (10 µg)	Amicacina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Tobramicina (10 µg)	Tigeciclina (15 µg)	Fosfomicina (200 µg)	Nitrofurantoina (100 µg)	Sulfametoxazol-trimetoprima (23, 75/1, 25/ µg)								
10	10if A3 (CT)	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	10if B1 (KB)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		
10	10if B2 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
10	10if B3 (CT)	S	S	S	S	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
10	10if C1 (AC)	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S			
10	10if C2 (EC)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
10	10if C3 (CT)	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S			
11	11if A1 (EC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
12	12ir B (EC)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
13	13ar A* (EC)	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	I	S	I	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R			
13	13ar C (EC)	R	R	S	S	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R			

Legenda:

S	Sensível, dose padrão
R	Resistente
I	Sensível, aumentando exposição

i- internação; a- alta; r- retal; f- fezes; n- nasal; l- leito.

A: Ceftriaxona (2ug/mL); B: Meropenem (2ug/mL); C: Polimixina B (2ug/mL). * indica confirmação da resistência encontrada na seleção. # indica isolado produtor de ESBL. TSA para polimixina é por microdiluição e não foi realizado nesse trabalho.

EC: *E. coli*; PT: *Proteus* spp.; KB: *Klebsiella* spp.; MG: *Morganella* spp.; ST: *Serratia* spp.; EB: *Enterobacter* spp.; CT: *Citrobacter* spp.; AC: *Acinetobacter* spp..

Fonte: Própria autora.

É importante comentar que para a seleção dos isolados foram utilizados alguns antimicrobianos, como mencionada na metodologia, um exemplo é a ceftriaxona, que para a seleção foi utilizada a concentração de (2 mg/L). O isolado 1irA3 que na seleção foi resistente (*Proteus* spp. resistente à ceftriaxona) no TSA se apresentou sensível à ceftriaxona (30 µg), o que demonstra que houve falso positivo na seleção, mas como se trata de um método de triagem é interessante maior sensibilidade do que especificidade, ou seja, maior chance de falsos positivos, que foram detectados posteriormente no TSA.

Em relação aos antimicrobianos mais utilizados para tratamento de infecções bacterianas em hospitais, as penicilinas e penicilinas combinadas com inibidores de beta-lactamases, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, o perfil de sensibilidade dos isolados foram: 40 (60,6%) isolados resistentes à ampicilina, 17 (25,7%) resistentes à ampicilina-sulbactam, 19 (28,8%) resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico e 7 (10,6%) resistentes a piperacilina-tazobactam. Em relação às fluoroquinolonas, a resistência ao ciprofloxacino é maior e corresponde à 34,9% (23 isolados). Já os isolados com resistência aos aminoglicosídeos é mais baixa, 4 (6%) resistentes à amicacina, 11 (16,7%) resistentes à gentamicina, 20 (30,3%) resistentes à tobramicina e 10 (15,2%) resistentes à tigeciclina. Todas as resistências intrínsecas foram excluídas das análises.

As enterobactérias possuem diferentes formas de adquirir resistência a diferentes antimicrobianos, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Importantes mecanismos de resistências são a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e as beta-lactamases AmpC. Esses e outros mecanismos dificultam as opções terapêuticas para o tratamento de possíveis infecções, podendo levar a morte. Bactérias produtoras de ESBL estão normalmente associadas a infecções urinárias, pneumonias, septicemias, bacteremias e meningites, além de outras infecções. (DIRAR,2020).

Ao realizar o TSA, além de dispor os discos de forma a identificar a resistência das bactérias aos antimicrobianos, também foi possível identificar mecanismos de resistência fenotípicos como a produção de enzimas do tipo ESBL (β-lactamases de espectro estendido)

como já ilustrado na Figura 9. Esse mecanismo de resistência foi identificado em 9 bactérias (13,6%) dos 66 isolados.

Os genes que codificam essas enzimas geralmente estão localizados em plasmídeos, os quais, além de poderem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, geralmente possuem outros genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos além dos beta-lactâmicos. Assim, enterobactérias produtoras de ESBL são classificadas como problema grave e urgente de saúde, além de terem piores prognósticos, maior taxa de mortalidade e aumentarem os custos dos serviços de saúde (CDC,2019; BASSETI,2015).

As bactérias que mais comumente possuem genes para ESBL dentre as enterobactérias são *E. coli* e *K. pneumoniae*. No presente estudo, todos os isolados produtores de ESBL eram *E. coli*. Assim como encontrado por Rodrigues e colaboradores (2016), em uroculturas de pacientes transplantados renais, onde 50% das cepas positivas para ESBL eram *E. coli* e apenas 22,1% *K. pneumoniae* (RODRIGUES, 2016). Esses dados divergem de outros estudos em que *K. pneumoniae* possui as maiores taxas de ESBL. Em um estudo realizado em centros médicos da América Latina, somente 24,7% das bactérias com fenótipo ESBL eram *E. coli* e 52,7% eram *Klebsiella* spp. (GALES, 2012); assim como outro estudo realizado no Hospital Universitário da UFSC revelou que 65% dos isolados de *K. pneumoniae* e 13,4% de *E. coli* eram produtoras de ESBL (ZAMPARETTE, 2014). Essa diferença pode estar associada ao tipo de amostra do presente estudo, onde *E. coli* apresenta maior prevalência, além da diferença de amostras provenientes de infecção ou colonização.

Através da classificação proposta por Magiorakos (2012), 27 (41%) isolados podem ser classificados como MDR (multidroga resistente), não sendo sensíveis a pelo menos 1 fármaco em 3 ou mais categorias de antimicrobianos, sendo eles: 22 *E. coli*, 1 *Morganella* spp., 1 *Serratia* spp., 1 *Klebsiella* spp. e 2 *Acinetobacter* spp., e 3 isolados (4,5%) classificados como XDR (extensivamente resistente), ou seja, possuem resistência a pelo menos 1 fármaco em todas, exceto 2 ou menos categorias de antimicrobianos. Todas as bactérias consideradas como XDR são *Klebsiella* spp. Como não foram testados os antimicrobianos da classe dos fenicóis (cloranfenicol) e polimixinas (colistina), não foi possível avaliar isolados PDR.

Os microrganismos multiressistentes que foram encontrados nos isolados dos pacientes é um fato preocupante, visto que, estes microrganismos permanecem no organismo dos pacientes por um período, e neste caso, há possibilidade de transferência horizontal de genes

de resistência entre as bactérias patogênicas e as da biota normal. Além disso, pode haver uma recontaminação do próprio paciente e o mesmo contaminar profissionais da saúde e pessoas próximas. Outro ponto é relacionado à colonização dos pacientes com bactérias resistentes antes mesmo de ficarem internados no hospital, o que demonstra a circulação desse tipo de bactérias no meio onde vivem. Assim, bactérias resistentes não estão apenas restritas em hospitais, mas sim, espalhadas pela comunidade, podendo colonizar ou infectar pacientes que não tiveram internação prévia em hospitais (ZAMPARETTE, 2019).

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Dos 13 pacientes, 9 (69,2%) são referentes a pacientes do sexo masculino e 4 (30,8%) referentes ao sexo feminino. O tempo de internação variou de 2 a 43 dias.
- Em relação ao uso de antimicrobianos utilizados durante a internação 9 (69,2%) usaram, 2 (15,4%) não usaram e 2 (15,4%) não foram informados, sendo que a quantidade de antimicrobianos em uso variou de 0 a 7.
- Dos 128 isolados obtidos, 66 (51,5%) pertencem a ordem das Enterobacterales e dentre eles: *E. coli* 43 (62%), *Klebsiella* spp. 7 (10,1%), *Serratia* spp. 4(5,8%), *Enterobacter* spp. 2 (2,9%) e *Proteus* spp. 2 (2,9%), *Citrobacter* spp. 6 (8, 7%) e *Morganella* spp. 3 (4,3%). Foram 9 isolados de bactérias Gram-negativas não fermentadoras (6,9%), dentre eles: 7 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (77,7%) e 2 de *Acinetobacter* spp. (22,2%). Foram isoladas 53 colônias de bactérias Gram-positivas (41%), sendo elas *Staphylococcus coagulase negativa* 32 (66,4%), *S. aureus* 12 (22, 6%) e *Enterococcus* spp. 9 (17%).
- O perfil de sensibilidade dos isolados da ordem Enterobacterales demonstrou 40 (60,6%) isolados resistentes à ampicilina, 17 (25,7%) resistentes à ampicilina-sulbactam, 19 (28,8%) resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico e 7 (10,6%) resistentes a piperacilina-tazobactam; 23 resistentes ao ciprofloxacino (34,9%); 4 (6%) resistentes à amicacina, 11 (16,7%) resistentes à gentamicina, 20 (30,3%) resistentes à tobramicina e 10 (15,2%) resistentes à tigeciclina.
- ESBL foram encontradas em 9 BGN (13,6%) dos 66 isolados.
- Pela classificação de Magiorakos (2012), 27 (41%) isolados podem ser classificados como MDR, são elas: 22 *E. coli*, 1 *Morganella* spp., 1 *Serratia* spp., 1 *Klebsiella* spp. e 2 *Acinetobacter* spp., e 3 isolados (4,5%) XDR, os quais todos são de *Klebsiella* spp.

8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As bactérias caracterizadas como resistentes neste estudo já estavam presentes nas amostras dos pacientes oriundos do oeste de Santa Catarina no momento da internação, o que corrobora a questão da disseminação de genes resistentes em ambientes de criação animal, como no oeste do estado, um grande produtor de suínos e aves. Além disso, pacientes também adquiriram bactérias resistentes no momento da alta do hospital o que demonstra que existe grande circulação de bactérias resistentes pelas alas do hospital, onde provavelmente medidas de higiene e contenção de patógenos não estão sendo efetivas.

Através da análise dos resultados observa-se maior necessidade de higienização dos leitos nos hospitais, além de maior controle de disseminação de patógenos entre os pacientes e profissionais de saúde para que não haja circulação e contaminação.

Há a necessidade de maior controle de uso de antimicrobianos na criação animal, visto que estes pacientes que vivem em cidades com grande criação de animais estão vindo para o hospital infectados por microrganismos resistentes. Porém, para a afirmação dessa possibilidade é interessante que seja feito coletas de amostras da casa dos pacientes (pias e esgoto), bem como do local de criação dos animais para verificar se as mesmas bactérias resistentes também são encontradas e assim fazer a dinâmica da circulação desses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- Andersson, D., Hughes, D. **Efeitos microbiológicos dos níveis subletais de antibióticos.** Nat Rev Microbiol 12, 465-478 (2014).
- Anvisa. (2007). Mecanismos de ação em Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em: 07 de Out de 2019.
- BD. **BD CHROMagar Orientation.** 2019. Disponível em:
<<http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=9114>> Acesso em: 10 de Out de 2019.
- BD. **BD MacConkey II Agar.** 2014. Disponível em:
<<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9073>> Acesso em: 10 de Out de 2019.
- BD. **BD Mannitol Salt Agar.** 2013. Disponível em: <
<https://www.bd.com/resource.aspx?id=9074>> Acesso em: 10 de Out de 2019.
- Barros, Livia Moreira, et al. **Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil.** Rev Ciênc Farm Básica Apl, v.33, n.33, p.429-435. 2012.
- Bassetti, M., & Righi, E. (2015). **Desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos para combater múltiplos organismos resistentes.** Archives of Surgery de Langenbeck, 400 (2), 153-165.
- Berthe F., Bouley T., Osewe P. (2017). Uma economia da saúde para pessoas saudáveis, agricultura e meio ambiente. Disponível em :< <https://blogs.worldbank.org/health/one-health-economics-healthy-people-agriculture-and-environment>>.

Bisht, R., Katiyar, A., Singh, R., Mittal, P., 2009. **Resistência a antibacterianos - uma questão global preocupante.** Asian J. Pharm. Clin. Res. 2, 34-39.

Bush, K.; Jacoby, G. A. **Classificação funcional atualizada de beta-lactamases.** Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010.

Bush K. **Perspectivas passadas e presentes sobre β -lactamases.** *Antimicro Agents Chemother.* 2018 Sep 24; 62 (10):e01076-18.

BrCAST - **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.** Versão 6.0 (Janeiro de 2017). Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>> Acesso em: 28 de Out de 2019.

Carlet J, Collignon P, Goldmann D, et al. **Falha da sociedade em proteger um recurso precioso: antibacterianos.** Lancet 2011; 378:369-371.

CDC. 2018. **One Health Basics.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>>.

CDC. 2019. **Ameaças de resistência antibiótica nos Estados Unidos.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>>.

Cerqueira ES, Almeida RCC. ***Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática.** Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2013; 72(4):268-81.

CHROMagar. **CHROMagar™ Orientation.** 2019. Disponível em:<http://www.chromagar.com/fichiers/1483453721LF_EXT_002_RT_V6.1_Siteweb.pdf?HPSESSID=99d910fce899249d8004c92db0678295> Acesso em: 10 de Out de 2019.

Davies J, Davies D. **Origens e evolução da resistência aos antibacterianos.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74 (3): 417-433. *The State of the World's Antibiotics*, 2015. Washington DC: Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, 2015.

Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., & Courvalin, P. (2007). **Modos e modulações da expressão gênica de resistência a antibacterianos.** *Clinical microbiology reviews*, 20 (1), 79–114.

Dirar, M., Bilal N., Ibrahim ME., Hamid M.. **Padrões de resistência e detecção fenotípica de enzimas beta-lactamases entre isolados de Enterobacteriaceae de hospitais de referência no estudo de Cartum, Sudão.** *Cureus.* 13 de Março de 2020; 12(3): e7260. Doi: 10.7759/cureus.7260.

Dzidic, S., Suskovic, J., Kos, B., (2008). **Mecanismos de resistência a antibacterianos em bactérias: aspectos bioquímicos e genéticos.** *Food Technology Biotechnology.* 46(11), 11-21.

Estrela, T. S. **Resistência Antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira.** In: Bruno Pereira Rezende; Fabio Rocha Frederico; Wesley Lopes Kuhn. (Org.). *Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde: (1998-2018)*. 1ed. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2018, v. 1, p. 11-364.

Fariñas, M. C.; Martínez-Martínez, L. **Infecções bacterianas Gram-negativas multiresistentes: Enterobacteria, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii e outros bacilos Gram-negativos não fermentativos.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 31, n. 6, p. 402-9, 2013 Jun-Jul 2013.

Furuya, Y., Lowy, F. (2006). **Bactérias resistentes a antimicrobianos na comunidade.** *Nature Publishing Group*, 4(1), 36-45.

Gales, A. C. et al. **Resistência antimicrobiana em bacilos Gram-negativos isolados da América Latina: Resultados do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY**

(América Latina, 2008 - 2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, n. 4, p. 354–360, 2012.

Gavronski, S. **Investigação da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em um hospital de Blumenau/SC: Detecção laboratorial e aspectos epidemiológicos.** 2017. Disponível em: <
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/181600/349066.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

Giske, Christian G et al. **“Impacto clínico e econômico de bacilos gram-negativos multirresistentes e resistentes a medicamentos.”** *Agentes antimicrobianos e quimioterapia* vol. 52, 3 (2008): 813-21.

Innes GK *et al.* **Custos sociais externos da resistência antimicrobiana em humanos atribuíveis ao uso antimicrobiano na pecuária.** *Annu Rev Saúde Pública*. 2020. 10.1146.

JERNBERG, C., et al. **Impactos a longo prazo da exposição a antibióticos na microbiota intestinal humana.** *Microbiology.*, v.156, p.3216-23, 2010.

Kohanski, MA, Dwyer, DJ e Collins, JJ (2010). **Como os antibacterianos matam bactérias: dos alvos às redes.** *Comentários da natureza. Microbiology*, 8 (6), 423-435.

Kramer, A.; Schwebke, I.; Kampf, G. **Por quanto tempo os patógenos nosocomiais persistem em superfícies inanimadas? Uma revisão sistemática.** *BMC Infectious Diseases*, v. 8, p. 1–8, 2006.

Magiorakos A.P., Srinivasan, R. B. Carey et al. **Bactérias multirresistentes, extensivamente resistentes e pan droga resistentes a medicamentos: uma proposta internacional especializada para definições padrão provisórias para resistência adquirida.** *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 3, pp. 268–281, 2012.

Mapas BLOG. Mapas de Santa Catarina. 2015. Disponível em: <
<https://mapasblog.blogspot.com/2011/10/mapas-de-santa-catarina.html>>

Mayer, G. (2010). **Troca genética em Microbiologia e Imunologia** On-line. <
<https://www.microbiologybook.org/mayer/genetic%20ex.htm>> Acesso em: 28 de Set de 2019.

OMS. Lista prioritária global de bactérias resistentes a antibacterianos para orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos [Internet]; 2017.

Disponível em: < http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. Acesso em: 01 de Out de 2019.

O'Neill, J. **Lidando com infecções resistentes a medicamentos em todo o mundo: relatório final e recomendações**. The Review on Antimicrobial Resistance: 84 p. 2016.

Palma E., Tilocca BD., Roncada P. **Resistência Antimicrobiana em Medicina Veterinária: Uma Visão Geral**. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21 (6).

Pereira VC., Romero LC., Pinheiro-Hubinger L., *et al.* **Estafilococos coagulase-negativos: Um estudo de 20 anos sobre o perfil de resistência antimicrobiana de isolados de hemocultura de um hospital de ensino**.2020. Braz Infect Diz.2020, 19 de fev. Pii: S1413-8670 (20) 30017-9.

Quimera ZL., Mshana SE., Rweyemamu MM., *et al.* 2020. **Uso e resistência antimicrobiana em animais produtores de alimentos e no meio ambiente: uma perspectiva africana**. Antimicrob Resist Infect Control, 9, Número do artigo: 37.

Rodrigues, FC, Mesquita, AR. Enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas de transplantados renais: frequência e perfil de resistência. Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC). 2016; 48(2):129-32.

SANTOS, André Luis dos *et al.*. **Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar**. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro , v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007 .

Smith, R.; Coast, J. **The true cost of antimicrobial resistance**. BMJ, v. 346, p. f1493, Mar 2013.

Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, Christinne L; **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva...[et al.]; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca.- 10.ed.- Porto Alegre: Artmed, 2012.

THEURETZBACHER, Ursula. **Resistência antimicrobiana global em patógenos Gram-negativos e necessidade clínica**. 2017, 39: 106–112.Elsevier.

Wu S., Huang J., Zhang F., *et al.* **Prevalência e caracterização de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina relacionada a alimentos (MRSA) na China**. 2019. Front Microbial Feb 20;10:304.

Wright, G. D. **Resistência bacteriana a antibacterianos: degradação e modificação enzimática**. Adv Drug Deliv Rev, v. 57, n. 10, p. 1451-70, Jul 2005.

Yangzom, T., & Kumar Singh, TS (2019). **Estudo de espécies de Enterococcus resistentes a aminoglicosídeos e vancomicina de alto nível e avaliação de um teste rápido no local para enterococos do Hospital Central de Referência, Sikkim, Índia**. Jornal de médicos de laboratório, 11 (3), 192–199.

Zamparete, C.P. **Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)**. 2014. (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Zamparete, C.P. **Caracterização molecular de enterobactérias multirresistentes**. 2019. (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
 Centro de Ciências da Saúde - CCS
 Centro de Ciências Biológicas - CCB
 Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC
 Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade
 CEP: 88.040-900 – Florianópolis – SC



ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Título do Projeto: Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal.

Você está sendo convidado a participar como voluntário do trabalho de pesquisa: *Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal*. Estamos consultando você sobre a possibilidade de utilização de *swabs* de mãos, *swabs* nasais e amostras de fezes, previamente coletados para a pesquisa de bactérias e genes de resistência antimicrobiana, frente a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que é também um pedido de autorização para o uso de amostras biológicas neste projeto de pesquisa.

Para você decidir se gostaria de participar e autoriza o uso dessas amostras nas investigações propostas neste projeto de pesquisa, você precisa conhecer os objetivos deste projeto, os benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo, você poderá fornecer o seu consentimento de participação ou não, sendo que em caso de aceite solicitaremos sua assinatura, data e local neste TCLE.

PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO DE PESQUISA

Devido à importância do uso de antimicrobianos (que você deve conhecer como antibióticos) na indústria animal e ao crescimento do número de microrganismos resistentes aos antibióticos (MRA) na saúde humana, neste projeto o objetivo principal é compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de genes de resistência aos antibióticos através do estudo de genes de resistência (resistoma) empregando métodos conhecidos como metagenômica. Isso permitirá principalmente: a) compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de resistência aos antibióticos; b) fornecer novos dados para o sistema de vigilância e análise, ampliando os locais a serem testados e fornecendo uma caracterização mais completa dos mesmos.

Para isso uma análise microbiana será realizada a partir de amostras obtidas de pacientes internados no Hospital Universitário (HU) Polydoro Ernani de São Thiago oriundos do oeste do estado de Santa Catarina, um dos seus familiares, sistemas de transporte desses indivíduos e suas casas. Em paralelo, oito granjas de suínos e oito granjas de aves de corte no oeste de Santa Catarina (representando mais de 20.000 suínos e 400.000 aves) participarão do estudo através de amostras obtidas dos albergues dos animais, do sistema de drenagem das granjas e dos cuidadores dos animais dessas granjas.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Para o caso específico deste TCLE serão visitados pacientes em internação atual no HU provenientes do oeste de Santa Catarina para apresentar o projeto intitulado *"Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal"*, convidando tais sujeitos a participarem como voluntários neste trabalho de pesquisa. Os sujeitos receberão todas as informações sobre este projeto. Uma vez aceita sua participação, será realizada a coleta de *swabs* e fezes em duas ocasiões: no momento da internação e na alta. Os *swabs* serão coletados a partir das narinas e do reto (somente no caso de não ser possível a coleta de fezes). Estas amostras consistem no uso de um dispositivo parecido a um cotonete que será colocado em contato com a superfície de suas narinas ou reto. Através de movimentos circulares e de ir e vir serão coletadas as amostras citadas. Adicionalmente, será solicitada também uma amostra de fezes obtida de forma espontânea em frasco específico para tal procedimento e fornecido pela equipe de pesquisa. Finalmente, uma amostra de *swab* será coletada da casa do paciente aos 3 meses da alta, sendo ela coletada do sistema de drenagem da pia da cozinha. Os procedimentos não produzem nenhum tipo de dor, mas podem apresentar algum desconforto, e as amostras coletadas serão codificadas visando o sigilo do nome do doador das amostras. As amostras coletadas servirão para análises de caracterização dos microrganismos presentes nesses locais anatómicos, realizados através de técnicas conhecidas como metagenômica e técnicas de cultura de microrganismos conhecidas como microbiológicas. Uma amostra adicional de cada tipo e local coletado servirá para formar um biorepositório, o qual está explicitado na continuação.

BIORREPOSITÓRIO

Devido a que as técnicas a serem empregadas nas análises descritas são dispendiosas, sendo os procedimentos dessas análises constantemente melhorados pela comunidade científica, e que o projeto envolve uma logística também dispendiosa, está planejado a formação de um biorrepositório com amostras coletadas dos indivíduos participantes. Esse biorrepositório consiste num conjunto de amostras que são guardadas pelos pesquisadores com a finalidade de uso durante o presente projeto de pesquisa mas também com a possibilidade de uso em futuros projetos. Durante todo o tempo de existência do biorrepositório ele será de responsabilidade da Universidade Federal de Santa Catarina e gerenciado pelos pesquisadores responsáveis do presente projeto (citados abaixo). A assinatura do presente TCLE permitirá o uso das suas amostras para a confecção desse biorrepositório e uso das amostras durante a execução do presente projeto. Caso esse biorrepositório seja considerado para uso em projetos futuros, tais projetos deverão ser aprovados primeiro pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC e nacional (se necessário) e posteriormente, você será contatado para ser apresentado a essas novas pesquisas, decidir confirmar ou não a sua participação, e permitir ou não o uso dessas amostras já colhidas.

RISCOS

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Mas, como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo além dos *swabs* nasais e retais neste projeto de pesquisa, então, não estão previstos riscos imediatos com a sua participação além de, tipicamente, algum grau baixo de desconforto durante a realização do *swab* nasal e/ou retal. As amostras coletadas servirão para as análises metagenômicas e microbiológicas, as quais serão armazenadas de forma sigilosa. Porém, mesmo que mínimo, orientamos da possibilidade de risco da quebra de sigilo, mediante situação específica, o qual será evitado através do acesso restrito à base de dados e a não identificação dos pacientes nas publicações e, caso ocorra, serão tratados em termos legais, pelos pesquisadores.

CUSTOS

É necessário esclarecer que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a participação neste projeto de pesquisa e, caso isso venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada, você será ressarcido em termos legais, por esta pesquisadora. Se ocorrer algum prejuízo material ou imaterial decorrente da pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente. Ainda assim, a pesquisadora compromete-se com o cumprimento das exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4 da referida resolução que rege esse termo. A sua participação neste projeto de pesquisa é voluntária, você deve se sentir confortável a desistir da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum risco de prejudicar seu atendimento ou sofrer alguma penalidade ou privilégio.

SIGILO E CONFIDENCIALIDADE

A equipe da pesquisa afirma a você que serão aplicados todos os procedimentos necessários para manter o SIGILO E CONFIDENCIALIDADE dos seus dados pessoais como participante da pesquisa assim como dos resultados obtidos com a análise das suas amostras. Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais, em nenhum momento durante o desenvolvimento desta pesquisa você será identificado (a). O seu nome não será divulgado em nenhuma circunstância. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste TCLE assinado em sigilo absoluto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto de pesquisa é completamente voluntária. Você pode recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo algum para você. Para isso, basta você entrar em contato com o pesquisador desse estudo, conforme nome e contatos a continuação.

DEVOLUTIVA DE RESULTADOS

Informamos que os resultados da pesquisa serão tornados públicos por meio de publicação mediante relatórios, artigos, apresentações em eventos científicos e/ou divulgação de outra natureza. Reiteramos que em todas as publicações ou divulgações, serão feitas mantendo o sigilo e a confidencialidade dos dados referentes à identificação dos participantes da pesquisa.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você também tem todo o tempo necessário que precisar, e quiser, para ler e analisar este TCLE. A pessoa responsável por explicar e obter as assinaturas neste documento, e que lhe explicou claramente o conteúdo destas informações, também se coloca à disposição para responder todas as suas perguntas sempre que precisar e tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de contatar os pesquisadores responsáveis do projeto de pesquisa toda vez que sentir necessário.

Como garantia, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será impresso em duas vias, sendo que você ficará com posse de uma, assinada e rubricada pelos pesquisadores. Guarde sua via, pois esta lhe fornece informações de contato e garante seus direitos como participante na pesquisa. Para finalizar, declaro que toda esta pesquisa está adequada com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde sob o n° 466, de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

DADOS DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO DE PESQUISA:

Nome completo: Thais Cristine Marques Sincero
Professora Pesquisadora, Microbiologista Celular e Molecular
Doc.de Identificação: 024.292.249-09
Endereço completo: Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde
Endereço de email: thais.sincero@ufsc.br
Telefones: (48) 3721-3474 / 999192240

Nome completo: Carlos Rodrigo Zárate Bladés
Professor Pesquisador, Imunologista Celular e Molecular
Doc.de Identificação: V294677-C / 224.653.348-16
Endereço completo: Setor F, Bloco A, Depto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, MIP; Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade.
Endereço de email: zarate.blades@ufsc.br
Telefones: (48) 3721-5210

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) – O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Você pode contatar o CEPSH no seguinte endereço: Universidade Federal de Santa Catarina Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Horários: 10 às 12h e 16 às 18h, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401 – Trindade, Florianópolis/SC, CEP: 88.040- 400, Contato: (48) 3721-6094 cep.propesq@contato.ufsc.br

IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO:

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____

IDENTIFICAÇÃO E ASSENTIMENTO/ANUÊNCIA DE PARTICIPANTE VULNERÁVEL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo (ou outra manifestação para identidade) _____
 Doc. de Identificação (se for o caso) _____

IDENTIFICAÇÃO E AUTORIZAÇÃO DO RESPONSÁVEL LEGAL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____
 Tipo de representação: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO:

"Declaro que, em ____/____/____, concordei em participar, na qualidade de participante do projeto de pesquisa intitulado *"Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal"*, após estar devidamente informado sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos de minha participação assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, que serão assinadas também pelo pesquisador responsável pelo projeto, sendo que uma cópia se destina a mim (participante) e a outra ao pesquisador."

"As informações fornecidas aos pesquisadores serão utilizadas na exata medida dos objetivos e finalidades do projeto de pesquisa, sendo que minha identificação será mantida em sigilo e sobre a responsabilidade dos proponentes do projeto."

"Não receberei nenhuma remuneração e não terei qualquer ônus financeiro (despesas) em função do meu consentimento espontâneo em participar do presente projeto de pesquisa."

"Declaro que estou ciente que parte das amostras coletadas servirão para a formação de um biorrepositório que ficará sob responsabilidade da UFSC e gerenciamento dos pesquisadores responsáveis da pesquisa. As amostras desse biorrepositório poderão ser empregadas para os fins do presente projeto de pesquisa e com possibilidade de serem usadas em projetos futuros. Sendo este último o caso, eu serei contatado para conhecer tais pesquisas novas e decidir ou não minha participação e uso ou não das amostras desse biorrepositório formado."

"Independentemente deste consentimento, fica assegurado meu direito a retirar-me da pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo, sendo que para isso comunicarei minha decisão a um dos proponentes do projeto acima citados."

 Assinatura do voluntário

Assinado de forma digital por Thais
 Cristine Marques Sincero:02429224909
 Dados: 2019.08.21 14:24:05 -03'00'

 Assinatura do Pesquisador (Thais Cristine Marques Sincero)

Florianópolis, ____ de ____ de 2019.