

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIEL GOMES COIMBRA

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS NA UNIDADE DE
EMERGÊNCIA DO AGreste-AL, ATRAVÉS DE PCR DE AMPLO ESPECTRO E
SEQUENCIAMENTO DE rRNA 16S

MACEIÓ
2011

DANIEL GOMES COIMBRA

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS NA UNIDADE DE
EMERGÊNCIA DO AGreste-AL, ATRAVÉS DE PCR DE AMPLO ESPECTRO E
SEQUENCIAMENTO DE rRNA 16S**

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do título de Mestre, pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, da Universidade Federal de
Alagoas - UFAL.

Orientador:
Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

Coorientador:
Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade

MACEIÓ

2011

**Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C679i Coimbra, Daniel Gomes.
Identificação de bactérias patogênicas isoladas na Unidade de Emergência do Agreste - AL, através de PCR de amplo espectro e sequenciamento de rRNA 16S / Daniel Gomes Coimbra. - 2011.
105 f. : il.

Orientador: Eurípedes Alves da Silva Filho.
Co-Orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 73-86.
Apêndices: f. 87-105.

1. Infecção hospitalar - Alagoas. 2. Bactérias resistentes. 3. Antimicrobianos. 4. rRNA16S. I. Título.

CDU: 616-022:614.4

AGRADECIMENTOS

Existem situações na vida em que é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de algumas pessoas. Para a realização deste trabalho, pude contar com várias. E a essas pessoas prestarei, através de poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, por permitir que tudo isto fosse possível, por minha vida e pelas oportunidades concedidas, sempre protegendo e guiando o meu caminho;

Aos meus pais, que sempre me incentivaram, apoiaram e foram modelos de garra e superação para mim;

À minha noiva Cecília, pelo amor, carinho, paciência e compreensão em todos os momentos que necessitei durante esta caminhada;

Ao Professor Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, orientador deste trabalho, pela oportunidade de cursar o mestrado, atenção e boa vontade concedidas a mim;

Ao Professor Dr. Tiago Gomes de Andrade, coorientador deste trabalho, pela amizade, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e na realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Alagoas, através do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde pela oportunidade de cursar esta Pós-Graduação;

À coordenação da Pós-Graduação nas pessoas da Professora Dra. Salete Smaniotto e o Professor Dr. Emiliano Barreto, pelos esforços e dedicação para o melhoramento do curso;

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por seus ensinamentos inestimáveis para a formação intelectual de seus alunos;

Aos Diretores da Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Prof. Dr. Williams Soares Batista, Prof. Dr. Márcio Aurélio Lins dos Santos e Profa. Dra. Eliane Aparecida Holanda Cavalcanti, que permitiram e contribuíram para que este estudo fosse possível;

Ao Professor Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva, pela colaboração e presteza no Laboratório DNA Forense - UFAL, e o Professor Dr. Dalmo Almeida de Azevedo, por sua boa vontade e prontidão para ajudar;

Ao Professor Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo, pela colaboração e apoio, no Laboratório de Bioinformática – UFPB;

Às Enfermeiras da Unidade de Emergência Dr. Daniel Houly, Vicentina Lôbo e Maria Karolina Marques, pelo apoio e a concessão do acesso aos pacientes internados;

Aos componentes da banca avaliadora por suas valorosas contribuições;

Aos amigos Felipe Sarmento, Alda Graciele e Elizabeth Bispo, pelo companheirismo, amizade e apoio essenciais nesta caminhada;

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica – LABMEG, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, que compartilharam tanto momentos bons, quanto difíceis;

A todos os colegas do Laboratório de Genética de Microbiologia Aplicada – BIOGEM, em especial à Krystianelly, Luana e Joyce, pelo companheirismo e ajuda em momentos importantes;

E a todos os amigos que de alguma forma, em algum momento, me ajudaram nesta jornada, aqui estão os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As infecções hospitalares são as mais frequentes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados principalmente em hospitais de trauma, onde a gravidade da lesão é fator preditivo para o surgimento de infecções. O presente estudo avaliou o perfil das infecções na Unidade de Emergência do Agreste (UEA) através de dados da CCIH e análise de amostras clínicas. O perfil de resistência aos antimicrobianos também foi determinado. Os isolados foram submetidos ao sequenciamento do gene rRNA 16S e análise no bancos GenBank e RDP para identificação. Dos 271 pacientes analisados, 154 (57%) exibiram positividade em cultura (CP). Acidentes automobilísticos foram os principais motivos de internação (47,2%). A mediana de internação foi de 26 dias, sendo 10 dias a mais em pacientes CP. O uso de sonda vesical foi de 15±13 dias, sendo 9,5 dias a mais em pacientes CP, em média. Das 252 CP, em 43 foram isolados mais de um microrganismo, totalizando 269 bactérias e 26 leveduras. *Pseudomonas aeruginosa* (16,9%) e *Acinetobacter baumannii* (12,9%) foram os mais frequentes. Estavam em uso empírico de antimicrobianos, 76,6% dos pacientes, sendo 58,1% por cefalosporinas. A vancomicina (100%) e o cloranfenicol (82,4%) foram os antimicrobianos de melhor atividade frente aos Gram positivos, e os carbapenêmicos (90,1%), entre Gram negativos. Os resultados da UEA, comparados aos programas de vigilância internacionais, exibiram maior resistência. No entanto, houve semelhanças com o programa brasileiro Rede RM, e ainda maior sensibilidade de *P.aeruginosa* frente aos carbapenêmicos e cefepime. Dos 202 microrganismos sequenciados, a atribuição de identificação por BLASTn nos bancos genéticos GenBank e RDP forneceram identificação, respectivamente de 88,1% e 88,6% em espécie; 7,9% e 6,4% em gênero; 3,5% e 4% em família e 0,5% e 1% em classe. Houve concordância entre os bancos de 84,7% em espécie; 93,7% em gênero e 99% em família. Os microrganismos mais frequentes foram *P. aeruginosa* (22,8%), *A. baumannii* (18,8%) e *Klebsiella pneumoniae* (11,9%). Entre os mais raros estão *Brevibacillus agri*, *Acinetobacter radioresistens*, *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium striatum*, *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida*, *Pseudomonas putida* e *Staphylococcus sciuri*. Em alguns casos, houve elevada similaridade entre diferentes espécies, não permitindo a atribuição de identificação. A diferenciação foi realizada através da criação de sequências consenso de referência por alinhamento no CLUSTALW para cada microrganismo que apresentou similaridade. Dos 10 casos determinados somente como *Klebsiella*, 7 eram *K. pneumoniae*, 2 *K. granulomatis* e 1 sem definição. Das 11 *Enterobacteriaceae*, 3 foram *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter cancerogenus*, 2 *Enterobacter* sp., 2 *E. coli* / *Shigella* e 2 sem definição. As 2 sequências com mesma pontuação para *Serratia marcescens* e *Pseudomonas fluorescens* foram identificadas como *S. marcescens*. A identificação por sequenciamento é superior aos testes fenotípicos, sobretudo para isolados com perfil bioquímico atípico, crescimento lento, espécies raras e microrganismos de difícil cultivo. Apesar das dificuldades para implantação do serviço e a necessidade de cautela na atribuição de identificação, o sequenciamento permanece como uma técnica promissora para a utilização em laboratórios de rotina, orientando adequadamente a equipe médica para um melhor manejo do paciente.

Palavras-Chave: Bactérias. Infecção hospitalar. Resistência aos antimicrobianos. rRNA 16S.

ABSTRACT

Hospital infections are the most frequent complications occurring in hospitalized patients, especially in trauma hospitals, where the seriousness of the injury is predictive factor for the emergence of infections. This study evaluated the profile of infection in the Emergency Unit of Agreste (UEA) through data from CCIH and analysis of clinical samples. The antimicrobial resistance profile was determined too. Isolates have been subjected to 16S rRNA sequencing and analysis in GenBank and RDP. Among 271 patients analyzed, 154 (57%) exhibited positivity in culture (PC). Automobile accidents were the main causes of hospitalization (47,2%). The median of hospitalization was 26 days. PC patients were 10 days more than the median. The use of urinary catheter was 15 ± 13 days, being more 9,5 days in patients PC, on average. Of the 252 PC, 43 were isolated over a microorganism, totaling 269 bacteria and 26 yeasts. *Pseudomonas aeruginosa* (16,9%) and *Acinetobacter baumannii* (12,9%) were more frequent. Antimicrobial empirical therapy was made by 76,6% of patients, being 58,1% by cephalosporins. Vancomycin (100%) and chloramphenicol (82,4%) were the most sensitive between the antimicrobial Gram positive cocci, and carbapenems (90,1%) among Gram negative bacilli. The results of UEA compared to international monitoring programmes exhibited greater resistance. However, there were similarities with the Brazilian program RM Network and even greater sensitivity of *P. aeruginosa* to cefepime and carbapenems. Two-hundred-two sequenced microorganisms were identified by BLASTn at GenBank and RDP banks. They provided identification, respectively: 88,1% and 88,6% in species; 7,9% and 6,4% on genus; 3,5% and 4% in family; and 0,5% and 1% in class. There was agreement among banks in 84,7% to species; 93,7% in genus and 99% in family. The microorganisms most frequently were *P. aeruginosa* (22,8%), *A. baumannii* (18,8%) and *Klebsiella pneumoniae* (11,9%). Among the rarest microorganisms are *Brevibacillus agri*, *Acinetobacter radioresistens*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium striatum*, *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida*, *Pseudomonas putida* and *Staphylococcus sciuri*. In some cases there was a high similarity between different species not allowing assignment of identification. The differentiation was accomplished through the creation of consensus sequences with reference sequences for CLUSTALW alignment for each microorganism that has similarity. Among 10 cases identified only as *Klebsiella*, 7 were *K. pneumoniae*, 2 *K. granulomatis* and 1 without definition. Eleven *Enterobacteriaceae* were defined as: 3 *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter* *cancerogenus*, 2 *Enterobacter* sp., 2 group *E. coli* / *Shigella* and 2 without definition in genus. The 2 sequences with the same score to *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* strains were identified as *S. marcescens*. Identification by sequencing is superior to phenotypic tests, especially for atypical biochemist profile, slow growth, rare species and microorganisms of difficult cultivation. Despite difficulties for service deployment and the need for caution in attributing identification, sequencing remains as a promising technique for use in routine laboratories, guiding proper medical team for a better management of the patient.

Keywords: **Bacteria. Hospital infection. Antimicrobial resistance. 16S rRNA.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ribossomo bacteriano e suas subunidades.....	10
Figura 2 - Estrutura secundária do rRNA 16S de <i>Escherichia coli</i>	11
Figura 3 - Esquema do gene rRNA 16S, localizado na subunidade menor 30S.....	12
Figura 4 - Alinhamento entre duas sequências de DNA no GenBank	14
Figura 5 - Esquema para detecção de fenótipos de resistência para ESBL e AmpC	27
Figura 6 – Relação entre o tempo médio de uso de sonda vesical de demora e os resultados das culturas.....	36
Figura 7 - Testes para detecção de perfis de resistência.....	45
Figura 8 - Resultado de eletroforese em gel de agarose a 2% e amplicon de aproximadamente 500pb da amplificação parcial do gene rRNA 16S	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema de identificação de microrganismos através de alinhamento múltiplo e posicionamento de nucleotídeos para cada espécie ou grupo.....	50
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de reação de PCR para amplificação parcial do gene rRNA 16S com os iniciadores 16Sf e 16Sr.....	29
Tabela 2 - Caracterização dos pacientes internados na UEA e o isolamento de microrganismos em cultura.....	34
Tabela 3 - Análise das 487 amostras clínicas coletadas de pacientes internados quanto à presença de patógenos (cultura positiva).....	35
Tabela 4 - Distribuição de microrganismos por tipo de amostra. Informações provenientes da CCIH (UEA) e análise molecular do gene rRNA 16S (LABMEG) em bancos genéticos.....	37
Tabela 5 - Distribuição das 269 bactérias por setor de internação.....	38
Tabela 6 - Perfil de utilização empírica de antimicrobianos em pacientes internados com suspeita ou diagnóstico de infecção, e a positividade para patógenos em cultura.....	39
Tabela 7 - Antimicrobianos utilizados em terapia empírica em pacientes internados, a partir das 487 coletas de amostras microbianas e avaliação da resistência dos microrganismos isolados nesses pacientes, frente aos antimicrobianos administrados.....	40
Tabela 8 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos em 269 microrganismos classificados pela coloração de Gram.....	41
Tabela 9 - Perfil de resistência dos microrganismos da UEA e os programas de vigilância SARI, NHSN, EARS e SENTRY.....	42
Tabela 10 - Perfil de resistência dos microrganismos em relação aos dados da UEA e o programa de vigilância brasileiro - Rede de Resistência Microbiana.....	44
Tabela 11 - Mecanismos de resistência detectados nas amostras provenientes da UEA.....	45
Tabela 12 - Avaliação das 202 sequências bacterianas frente aos bancos genéticos GenBank e RDP quanto à semelhança e atribuição de identificação.....	47
Tabela 13 - Isolados bacterianos identificados através de diagnóstico molecular por BLASTn em bancos genéticos.....	48
Tabela 14 - Avaliação de microrganismos não-determinados pelo <i>score</i> do BLASTn e nova identificação através do esquema de identificação por alinhamento múltiplo / posicionamento de nucleotídeos para cada espécie.....	50

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EARS Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Ampliado
E-Value	Expect Value
IH	Infecção Hospitalar
ITU	Infecção do Trato Urinário
LABMEG	Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica
MDR	Multirresistente a drogas
MLS	Macrolídeos, Lincosamidas e Esteptograminas B
MRS	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Negativos Resistentes à Meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
NCBI	Nacional Center of Biotechnology Information
NHSN	National Healthcare Safety Network
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDP	Ribossomal Database Project II
Rede RM	Rede de Resistência Microbiana
SENTRY	Programa de Vigilância Epidemiológica e Resistência Antimicrobiana
SVD	Sonda Vesical de Demora
UEA	Unidade de Emergência do Agreste
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Infecção Hospitalar e Hospitais de Trauma	3
2.2 Resistência aos Antimicrobianos	5
2.3 Importância do Diagnóstico Preciso	7
2.4 Identificação Molecular de Bactérias	8
2.5 Estrutura do Gene rRNA 16S	11
2.6 Bancos Genéticos e BLASTn.....	12
2.7 Vantagens da Análise do Gene rRNA 16S	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	20
4.1 Critérios de Inclusão	20
4.2 Critérios de Exclusão	21
4.3 Local de Estudo	21
4.4 Local de Análise das Amostras	21
4.5 Origem dos Dados	22
4.6 Comitê de Ética em Pesquisa	22
4.7 Termo de Consentimento	22
4.8 Análise Microbiológica.....	23
4.8.1 Coleta de Amostras e Cultivo Primário	23
4.8.1.1 Urocultura	23
4.8.1.2 Exsudato Purulento de Feridas	24
4.8.1.3 Aspirado Traqueal	24
4.8.1.4 Hemocultura.....	25
4.8.2 Análise Fenotípica Básica.....	25
4.8.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	26
4.9 Análise Molecular.....	27

4.9.1 Extração de DNA	27
4.9.2 PCR de Amplo Espectro e Eletroforese.....	28
4.9.3 Purificações e Reação de Sequenciamento	29
4.9.4 Análise das Sequências nos Bancos Genéticos e Atribuição de Identificação.....	30
4.9.5 Alinhamento Múltiplo e Edição de Sequências	31
4.10 Bacterioteca	31
4.11 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Características sobre a Internação dos Pacientes.....	33
5.2 Microrganismos Isolados	36
5.3 Administração Empírica de Antimicrobianos.....	39
5.4 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos.....	40
5.5 Detecção de Mecanismos de Resistência.....	44
5.6 Análise Molecular.....	46
5.6.1 PCR de Amplo Espectro, Sequenciamento e Alinhamento por BLASTn	46
5.6.2 Alinhamento Múltiplo por CLUSTALW	48
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Internação de Pacientes e Microrganismos Associados às Infecções	52
6.2 Administração Empírica de Antimicrobianos.....	57
6.3 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos.....	58
6.4 Detecção de Mecanismos de Resistência	61
6.5 Identificação Molecular	63
6.6 Análise do gene rRNA 16S em Laboratórios de Rotina e seus Custos	68
7 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES	87
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Apêndice B - Microrganismos e Códigos das Sequências do GenBank Selecionados para Criação de Sequências Consenso para Cada Espécie	90
Apêndice C - Eletroferograma Produzido pelo Aparelho ABI 310, a Partir da Amostra 01-10/08.	90

Apêndice D - BLASTn em Banco de Dados NCBI (GenBank), Indicando <i>P. aeruginosa</i> com Maior Pontuação (Max Score).	91
Apêndice E - BLASTn em Banco de Dados RDP II, Indicando <i>P. aeruginosa</i> com Maior Pontuação (S_ab score).	91
Apêndice F - Criação de Sequência Consenso de <i>E. coli</i> Através de CLUSTALW, Mostrando as Diferenças entre as Sequências Depositadas no GenBank.	91
Apêndice G - Alinhamento Múltiplo de Sequências Consenso de Enterobactérias.	92
Apêndice H - Códigos Utilizados Para Descrição dos Nucleotídeos nas Sequências.	93
Apêndice I - Sequência de Nucleotídeos das Amostras Não Identificadas por BLASTn em Bancos Genéticos, Alinhadas por CLUSTALW Para Distinção Entre os Microrganismos..	94
Apêndice J - Sequências de Nucleotídeos das Amostras Identificadas Por BLASTn em Bancos Genéticos, Somente Aquelas Pertencentes ao Gênero <i>Klebsiella</i>.	97
Apêndice K - Números de Acesso das Sequências Depositadas no GenBank, Códigos de Acesso em Bacterioteca e Identificação dos Microrganismos.	99
Apêndice L - Artigo Aprovado para Publicação no Periódico Científico <i>New Microbiologica</i>	101

1 INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares representam um grave problema de saúde pública, pois são complicações frequentes em pacientes hospitalizados, prolongando o tempo de internação e acarretando em prejuízos diretos e indiretos à sociedade. A internação hospitalar expõe o paciente a microrganismos resistentes, sobretudo em pacientes traumatizados devido aos danos provenientes de sua lesão e a utilização de procedimentos invasivos que favorecem ainda mais a aquisição de infecções (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; MOURA et al., 2007; SALTZHERR et al., 2010).

O aparecimento de microrganismos multirresistentes a drogas tem sido uma grande preocupação em todo o mundo. Devido aos erros cometidos no passado, como prescrições inadequadas e a automedicação, associados à própria evolução dos microrganismos, vários mecanismos de resistência têm sido detectados, revelando inúmeros genes relacionados à resistência (WINN et al., 2008; JACOBY e BUSH, 2011). A Unidade de Terapia Intensiva representa o setor de maior risco de aquisição de infecção por microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar. Isto é decorrente de fatores relacionados ao paciente, às características dos microrganismos ali presentes e às atividades desenvolvidas no setor (KOLLEF e FRASER, 2001; RECINOS et al., 2009; WORRALL et al., 2010).

O diagnóstico preciso dos microrganismos envolvidos em infecções hospitalares é imprescindível para guiar a terapêutica medicamentosa aos pacientes. A análise fenotípica para identificação, largamente utilizada em laboratórios clínicos, possui limitações que podem fornecer resultados equivocados, e consequentemente danosos ao paciente (BOSSHARD et al., 2003). Alguns microrganismos possuem características que dificultam ou até impossibilitam a identificação convencional (HARRIS e HARTLEY, 2003).

A utilização de métodos moleculares para a identificação de microrganismos demonstrou ser superior quando comparados aos métodos fenotípicos (FOURNIER et al., 2003). A amplificação de ácidos nucléicos tem destaque por permitir um diagnóstico mais preciso e em tempo hábil. A utilização de iniciadores universais, que flanqueiam o gene rRNA 16S, este por apresentar alta conservação e propriedade para análises filogenéticas, é considerado o método de referência para identificação, quando associados ao sequenciamento e posterior análise em bancos genéticos (HARMSEN e KARCH, 2004).

As regiões variáveis do gene rRNA 16S possibilitam a comparação entre espécies diferentes e consequente identificação do microrganismo. Mesmo ao utilizar a amplificação parcial do gene, os resultados gerados demonstram maior praticidade no diagnóstico dos microrganismos (HALL et al., 2003; CLARRIDGE, 2004). Os bancos genéticos de sequências de DNA, através de uma ferramenta que busca, alinha e gera pontuações por similaridade às sequências permitem a atribuição de identificação àquele microrganismo (PETTI, 2007; SUN et al., 2007).

Assim, apesar da abundância de estudos publicados em outros países, fazem-se necessárias avaliações do perfil epidemiológico dos microrganismos causadores de infecção hospitalar em nosso Estado, particularmente em uma unidade pública de tratamento a politraumatizados do interior do Estado de Alagoas, através de identificação por metodologia molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção Hospitalar e Hospitais de Trauma

As infecções hospitalares (IH) são as mais frequentes e importantes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados. Uma infecção hospitalar acresce, em média, 5 a 10 dias ao período de internação. As consequências são diversas, como a redução na rotatividade dos leitos hospitalares, contribuindo para a indisponibilidade de leitos, influenciando nas superlotações, além da elevação dos gastos hospitalares relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

Pacientes hospitalizados estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, principalmente quando internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde se faz necessário o uso de antimicrobianos potentes e de largo espectro. Soma-se a isso, a utilização de procedimentos invasivos que facilitam a proliferação e penetração destes microrganismos no hospedeiro (MOURA et al., 2007).

Segundo a Portaria 2.616/1998 do Ministério da Saúde, a Infecção Hospitalar é definida como *“aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”*.

Apesar dos avanços das técnicas de esterilização e utilização de materiais descartáveis, as taxas de IH ainda são altas, particularmente em hospitais com poucos recursos. No Brasil, suas taxas são pouco conhecidas e os estados que têm algum dado podem não representar a realidade (TURRINI, 2002; PÓ, 2006).

Em 1995, Prade e colaboradores realizaram um inquérito sobre a taxa de IH nacional e indicaram que mesmo com a legislação vigente no país, os índices permanecem altos com 15,5%. Moura, em 2001, avaliou cinco hospitais de referência de Teresina/PI, em relação à prevalência de IH, observando 27,9% de infecção. Isto reforça que a taxa de IH nacional, além de diversificada em muitas instituições, pode estar subnotificada e seu índice real é provavelmente superior ao que tem sido publicado (MOURA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2009).

Em hospitais de trauma, os pacientes apresentam alto risco de desenvolver complicações (PORIES et al., 1991; MATHUR, 2008). A própria gravidade do trauma pode ser por si só, um fator preditivo para o surgimento de infecções (JAMULITRAT, NARONG e THONGPIYAPOOM, 2002). As razões para esta maior predisposição estão relacionadas às necessidades do paciente em decorrência do impacto do trauma, como a frequente utilização de ventilação mecânica, cateterismo vesical e vascular, cirurgias corretivas, diagnósticos invasivos, aumentando a susceptibilidade a infecções devido à abertura de múltiplas portas de entrada para bactérias (PAPIA et al., 1999; SALTZHERR et al., 2010).

Vários fatores estão associados ao trauma e devem ser avaliados, como o mecanismo do ferimento e sua severidade, o número e o tipo de órgão acometido, se houve contaminação pelo solo, a presença de corpos estranhos na lesão, como roupas, projéteis; progressão para o choque hipovolêmico e a necessidade de transfusão sanguínea (CAPLAN e HOYT, 1981; PORIES et al., 1991; MATHUR, 2008). Os danos à medula espinhal, à caixa torácica, presença de traumas múltiplos e hipotensão, são fatores preditivos para o desenvolvimento de infecções (PORIES et al., 1991; MATHUR, 2008).

Estima-se que os acidentes automobilísticos representam a 9^a causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). No Brasil, em conjunto com as mortes por homicídios conhecidos como causas externas, representam a 3^a causa de morte no país perdendo somente para as doenças cardiovasculares e neoplasias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a). Segundo dados do Ministério da Justiça e o Instituto Sangari em 2008, o Estado de Alagoas encontra-se em 1º lugar quanto à taxa de homicídios e o 15º em acidentes automobilísticos fatais, entre todos os estados brasileiros, acometendo principalmente a população jovem (WAISELFISZ, 2011).

Quando essas pessoas, vítimas de acidentes automobilísticos não vão a óbito, o desenvolvimento de complicações como as infecções podem levar a um grave problema social e econômico, pois elevam os dados de morbidade, mortalidade, prolongamento na permanência hospitalar e consequentemente aumento nos custos de cuidados médicos (SALTZHERR et al., 2010).

2.2 Resistência aos Antimicrobianos

A emergente e rápida disseminação de microrganismos multirresistentes a drogas (MDR) tem se tornado uma grande preocupação em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Apesar dos fatores que levam a resistência às drogas serem conhecidos como o uso indevido de antimicrobianos e a presença de elementos genéticos móveis nos microrganismos, vários hospitais ainda sofrem com casos de infecção por patógenos MDR.

Os estudos de Cohen em 1992, já alertavam para a intensa prescrição de cefalosporinas de 3^a geração e de outros antimicrobianos nos hospitais e na comunidade, além da utilização de técnicas higiênicas inadequadas, contribuíram para a disseminação e seleção de linhagens resistentes a vários antimicrobianos em todo o mundo.

No ambiente hospitalar, as UTIs representam o setor de maior risco de aquisição de microrganismos multirresistentes devido ao uso intenso de antimicrobianos de largo espectro e principalmente, à doença de base dos pacientes, pois frequentemente estão imunodebilitados (KOLLEF e FRASER, 2001).

A resistência bacteriana a um determinado antimicrobiano pode ser proveniente de duas possibilidades: a resistência intrínseca, que é uma característica natural a determinados grupos de bactérias; e a resistência adquirida, que ocorre por mutação genética ou através da transferência de material genético, como ocorre na conjugação, transdução, transformação e transposição (WINN et al., 2008).

Os mecanismos que as bactérias dispõem para resistir aos antimicrobianos são variados, entre eles estão: a produção de enzimas (inativam os antimicrobianos), alteração da permeabilidade da membrana (impedem a passagem do antimicrobiano), presença de efluxo ativo (expulsaativamente o antimicrobiano para fora da célula) e alteração do sítio de ligação ao antimicrobiano (modificando o sítio alvo onde haverá a ligação ao antimicrobiano) (WINN et al., 2008).

As beta-lactamases são enzimas que inativam antimicrobianos que têm em sua composição o anel beta-lactâmico. Estão entre eles, as penicilinas, cefalosporinas de 1^a a 4^a geração, monobactam e carbapenêmicos, antimicrobianos vastamente utilizados no ambiente hospitalar. Entre as beta-lactamases mais frequentemente estudadas, as beta-lactamases de

espectro estendido - ESBL (*extended spectrum beta-lactamase*) e a beta-lactamase do tipo AmpC, estão entre as mais importantes, pois estão presentes nos principais agentes infecciosos nosocomiais e comunitários, tendo a capacidade de inibir uma grande parte do arsenal antimicrobiano para o tratamento de infecções (ROSSI e ANDREAZZI, 2004; WINN et al., 2008).

As ESBL estão principalmente relacionadas às espécies da família *Enterobacteriaceae*. Já foram descobertos mais de 300 tipos de ESBL, sendo derivadas dos grupos TEM, SHV e CTX-M, que diferem de seus genitores por poucos aminoácidos (JACOBY e BUSH, 2011).

Vários genes responsáveis por resistência aos antimicrobianos foram caracterizados e os fenótipos mais frequentes podem ser triados através de testes de sensibilidade por disco-difusão de rotina. Entre os bacilos Gram negativos, os testes de triagem para detecção de mecanismos de resistência são: a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), determinada através do teste de aproximação de discos e formação da zona de inibição (zona fantasma), e a produção de beta-lactamase do tipo AmpC, evidenciada pelo teste de resistência induzível (D-teste) (CORMICAN, MARSHALL e JONES, 1996; LIVERMORE e BROWN, 2001; NCCLS, 2005).

As espécies de *Pseudomonas aeruginosa* carregam uma cefalosporinase AmpC que é similar às AmpC cromossomais de vários membros da família *Enterobacteriaceae* (CAMPBELL, CIOFU e HOIBY, 1997; HANSON e SANDERS, 1999). Cepas do tipo-selvagem de *P. aeruginosa* produzem apenas níveis basais de AmpC e são sensíveis aos beta-lactâmicos anti-pseudomonas (SANDERS e SANDERS, 1986). Entretanto, quando a produção de AmpC está significativamente elevada, há resistência a todos os beta-lactâmicos com exceção apenas dos carbapenêmicos (SANDERS e SANDERS, 1986; LISTER, WOLTER e HANSON, 2009).

Para a detecção da resistência aos carbapenêmicos, o teste modificado de Hodge e a sinergia por disco com EDTA têm sido utilizados (JESUDASON, KANDATHIL e BALAJI, 2005; ANDERSON et al., 2007).

Entre os cocos Gram positivos, a detecção de espécies de *Staphylococcus* com resistência à meticilina se faz importante, pois este perfil determina falha terapêutica para antimicrobianos beta-lactâmicos. Através da substituição das proteínas alvo para antimicrobianos presentes na membrana celular, por uma única proteína alterada, a PBP2a ou PBP2', codificada pelo gene *mecA*, os estafilococos modificam o sítio de ligação com o antimicrobiano, tornando-o ineficiente. Fenotipicamente, é possível detectar este mecanismo

de resistência, utilizando o disco de cefoxitina como marcador. Também é comumente pesquisada a resistência constitutiva/induzível ao grupo MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B) que são alternativas terapêuticas às infecções estafilocócicas (NCCLS, 2005).

A importância de se pesquisar a resistência aos beta-lactâmicos se deve ao fato de ser os antimicrobianos mais utilizados no ambiente hospitalar, principalmente na profilaxia cirúrgica, por apresentarem boa distribuição pelos tecidos, baixa toxicidade e menor custo (HARBARTH et al., 2000; POLK e CHRISTMAS, 2000).

Várias instituições internacionais têm tomado iniciativas para o combate ao surgimento e disseminação desses germes resistentes, através do monitoramento do perfil de resistência aos antimicrobianos. Programas de vigilância antimicrobiana foram desenvolvidos para delinear o perfil de resistência em diferentes países e continentes; e assim fornecer informações úteis no combate à resistência.

Os principais programas de vigilância governamentais são: o EARS-NET, *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe* (ECDC, 2010), programa europeu de vigilância do *European Center of Disease Prevention and Control* (ECDC); o SARI, *Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Intensive Care Units* (MEYER et al., 2003), programa alemão; e o NHSN, *National Healthcare Safety Network* (HIDRON et al., 2008), programa americano do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

Outros programas de vigilância, patrocinados pelas indústrias farmacêuticas, como o SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program* (JONES et al., 2009) e o MYSTIC, *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (TURNER et al., 1999), monitoram a prescrição e a resistência aos antimicrobianos, principalmente aos carbapenêmicos.

2.3 Importância do Diagnóstico Preciso

O diagnóstico preciso de uma infecção conduz a um manejo mais apropriado do paciente, fornecendo informações sobre o prognóstico e permitindo o uso de antimicrobianos

de menor espectro. É possível reduzir os efeitos colaterais ao paciente, evitando o uso de antimicrobianos potentes, inclusive os custos de internação e medicamentos, o que contribue para a diminuição da resistência bacteriana aos antimicrobianos (GOULD, 2002).

A identificação microbiológica em laboratórios clínicos é frequentemente baseada em métodos convencionais. Vários procedimentos são necessários, tais como observação da morfologia colonial, coloração de Gram, requerimentos nutricionais e/ou atividades enzimáticas. Além da necessidade de profissionais experientes, estes métodos consomem tempo e podem fornecer resultados ambíguos, ocasionando custos adicionais (BOSSHARD et al., 2003).

A identificação bacteriana errônea poderá conduzir o laboratorista a uma avaliação equivocada dos resultados, subestimando o potencial patogênico daquele microrganismo, podendo caracterizá-lo como pertencente à microbiota normal ou uma contaminação. A identificação segura do agente causador é imprescindível, pois permite a definição de características importantes em relação à doença; e laboratorialmente é necessária para a leitura e interpretação dos halos de inibição em sensibilidade/resistência aos antimicrobianos. As consequências destes resultados errados ao paciente são imensuráveis (HARRIS e HARTLEY, 2003).

Somente através da identificação do microrganismo é possível o reconhecimento de padrões de resistência intrínsecas, incomuns, novas ou emergentes. Sua importância está na redução de falhas terapêuticas com antimicrobianos, visto que auxilia na seleção adequada dos agentes antimicrobianos a serem utilizados nos testes de sensibilidade e, consequentemente no tratamento do paciente. Porém, algumas espécies bacterianas são de difícil isolamento, de crescimento lento e outras podem nem sequer exibir crescimento em cultura. Isto ocorre devido as suas características fisiológicas ou pelo próprio tratamento empírico dos pacientes com agentes antimicrobianos (HARRIS e HARTLEY, 2003).

2.4 Identificação Molecular de Bactérias

Entre as ferramentas utilizadas antigamente na identificação genética de microrganismos, a hibridização DNA-DNA, através do uso do genoma bacteriano como

sonda, foi considerada o “padrão ouro” para identificação (WAYNE et al., 1996). No entanto, suas características impediram o uso em larga escala, pois as técnicas eram de difícil execução, exigindo profissionais extremamente treinados; poucos laboratórios dispunham de equipamento e materiais necessários, e nem sempre era possível correlacionar as espécies (FOURNIER et al., 2003; CLARRIDGE, 2004).

Desde as últimas décadas, novas tecnologias baseadas na análise do DNA têm sido desenvolvidas. Estas permitem a amplificação e detecção de sequências de ácidos nucléicos a partir de células, tecidos e fluidos corporais. Os métodos de amplificação podem criar milhões de cópias idênticas de sequências de DNA ou RNA alvos.

Uma das metas das análises moleculares de bactérias patogênicas envolve o estabelecimento de um diagnóstico infeccioso preciso em situações onde os laboratórios de rotina normalmente não seriam capazes com as provas de identificação convencionais, ou não proveriam resultados em tempo adequado.

Inventada em 1983 por Kary Müllis, a Reação em Cadeia da Polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas tarefas, como o sequenciamento de genes e o diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de *fingerprint* genético (usado em testes de paternidade e na medicina forense), diagnóstico de doenças infecciosas, criação de organismos transgênicos, entre outros.

A estratégia de utilização da PCR com iniciadores específicos para detecção de patógenos é adequada, somente quando aqueles patógenos para os quais os iniciadores foram desenhados estiverem presentes. Neste sentido, o desenho do método não permite a determinação do agente etiológico quando estiver associado a sítios de infecção incomuns, ou em situações onde houver bactérias raras ou novas espécies. Nestes casos, a necessidade de reavaliação do agente infeccioso e o tempo despendido no diagnóstico poderiam comprometer o tratamento do paciente.

Nos anos 80, Woese e colaboradores avaliaram a proximidade filogenética entre espécies, comparando uma região conservada do código genético bacteriano codificadora de RNA ribossômico (rRNA) (FOX et al., 1980; WOENSE, 1987). O ribossomo bacteriano 70S (unidade de centrifugação de *Svedberg*) é composto por duas subunidades: a subunidade menor 30S, formada por 21 proteínas e uma fita simples de RNA, conhecido por rRNA 16S (aproximadamente 1540 nucleotídeos), e a subunidade maior 50S, contendo rRNA 23S (2904

nucleotídeos) e o rRNA 5S (120 nucleotídeos), formada por 34 proteínas, conforme mostrado na **Figura 1**.

Como os ribossomos são componentes indispensáveis do aparato de síntese protéica e suas estruturas são rigorosamente conservadas, a análise dos genes rRNA e os espaços intergênicos tornaram-se uma importante fonte para a identificação bacteriana (UEDA et al., 1999).

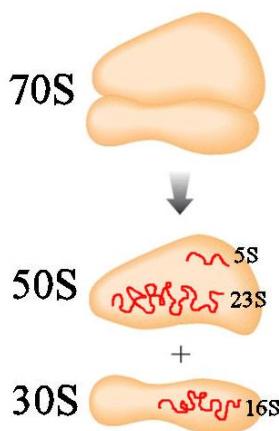


Figura 1 - Representação esquemática do ribossomo bacteriano e suas subunidades.
Adaptado de Terence A. Brown, 2002.

Atualmente, a parte do DNA mais comumente selecionada para fins taxonômicos é o gene rRNA 16S (CLARRIDGE, 2004). A PCR do gene rRNA 16S, ou PCR de amplo espectro (*broad-range PCR*) permite a identificação bacteriana através da análise da região funcional de rRNA 16S, presente em todas as bactérias. Possibilita a identificação a partir de um único par de iniciadores, independente de conhecimento prévio da espécie de microrganismo em estudo. O posterior sequenciamento do fragmento amplificado e análise de bioinformática contra um banco de dados de sequências de DNA permitem a identificação bacteriana em gênero e espécie (CLOUD et al., 2002).

Devido a maior facilidade na execução dos procedimentos, melhor acesso às tecnologias e menor custo em relação à hibridização DNA-DNA, a utilização de PCR do gene rRNA 16S e sequenciamento de DNA tornaram-se o novo “padrão ouro” na identificação microbiana (FOURNIER et al., 2003; HARMSEN e KARCH, 2004).

2.5 Estrutura do Gene rRNA 16S

A estrutura do gene rRNA 16S é composta por regiões altamente conservadas, intercaladas por 09 regiões hipervariáveis (V1-V9), (Figura 2). As regiões conservadas são responsáveis pela universalidade do gene alvo (semelhança em todas as bactérias) onde os iniciadores poderão se ligar. As regiões variáveis são resultados de substituições de bases, inserções ou deleções de pequenos segmentos de nucleotídeos, permitindo uma diferenciação entre as espécies. Sua importância filogenética está no fato de estar relacionada à composição genética de cada espécie de microrganismo (LUDWIG e SCHLEIFER, 1994; VAN DE PEER, CHAPELLE e DE WACHTER, 1996; CLARRIDGE, 2004).

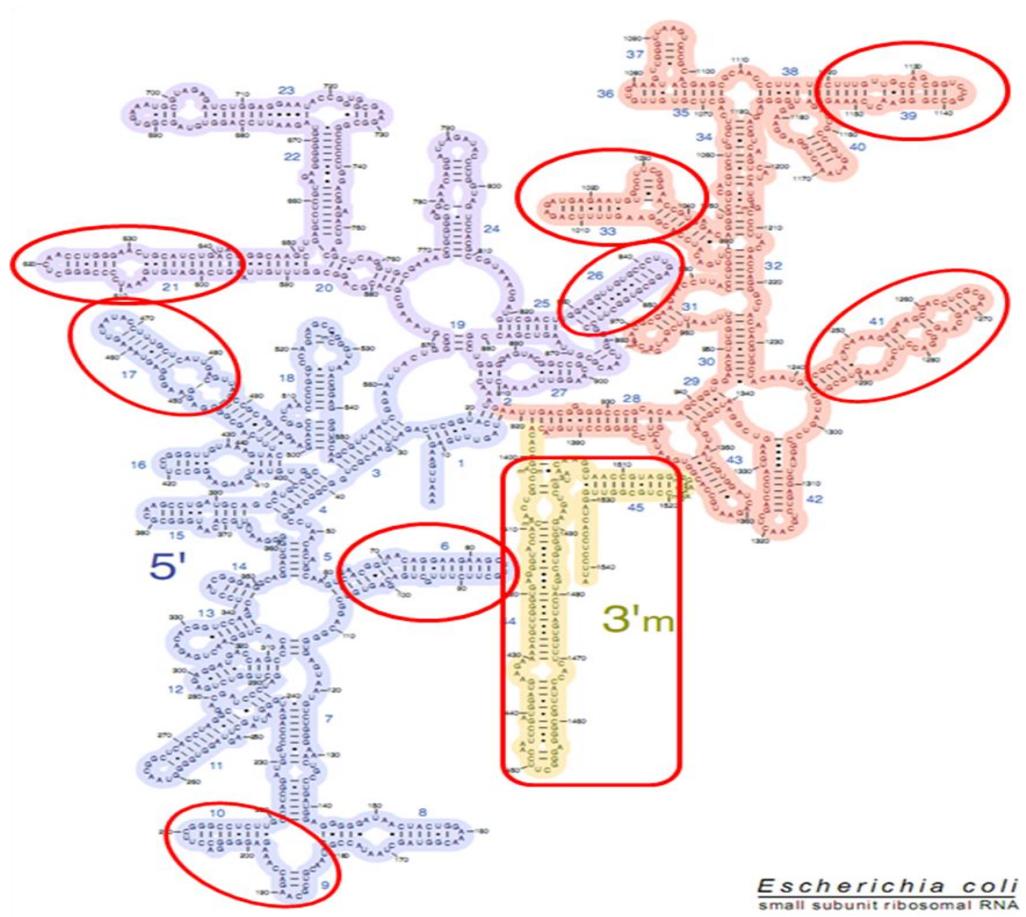


Figura 2 - Estrutura secundária do rRNA 16S de *Escherichia coli*. As regiões variáveis foram circundadas em vermelho. Adaptado de Yusupov e colaboradores, 2001.

Os iniciadores que delimitam o gene rRNA 16S são geralmente escolhidos com base nas 7 regiões mais conservadas do gene (**Figura 3**). A amplificação completa (1550pb) ou a parcial (500pb) do gene rRNA 16S são as mais comumente utilizadas para o sequenciamento e posterior análise. Nos bancos de dados, os tamanhos das sequências podem ser bastante variados (WILCK et al., 2001; BOSSHARD et al., 2003). Entretanto, alguns estudos demonstram que a amplificação parcial fornece resultados mais práticos e com menor custo, sem que haja perda importante na identificação entre as espécies bacterianas (TANG et al., 2000; HALL et al., 2003; CLARRIDGE, 2004).

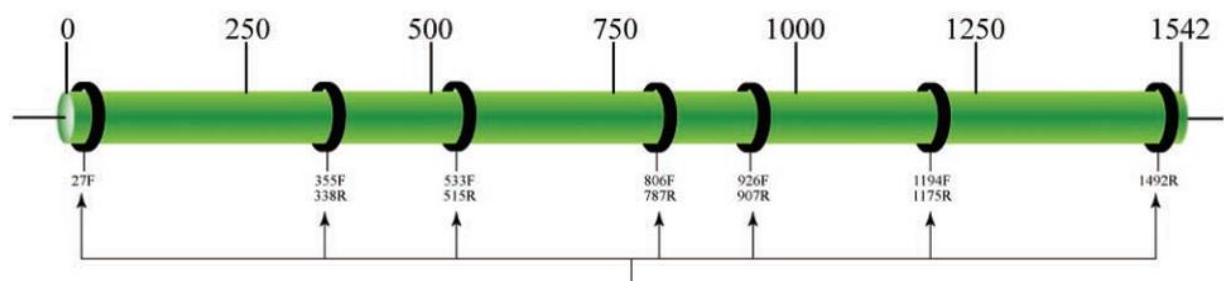


Figura 3 - Esquema do gene rRNA 16S, localizado na subunidade menor 30S. Os círculos pretos representam as regiões conservadas que servem como alvo para a amplificação e sequenciamento do DNA bacteriano.

Fonte: Petti, 2007.

Alguns estudos evidenciam a existência de sequências divergentes de rRNA 16S num mesmo microrganismo (ROGERS et al., 2003; OLIVIER, LEE e COTE, 2005). Esta microheterogeneidade em regiões do gene rRNA 16S pode ser gerada através de mutações que são introduzidas por falhas durante a replicação genética ou nos mecanismos de reparo (UEDA et al., 1999). Alguns sítios heterogêneos foram detectados na região designada hélice 10 da arqueobactéria *Haloarcula marismortui* e o fitoplasma *Phormium tenax*, e também na hélice 18 de *Haemophilus influenzae* (MYLVAGANAM e DENNIS, 1992; LIEFTING et al., 1996; NORSKOV-LAURITSEN, 2011).

2.6 Bancos Genéticos e BLASTn

O banco de dados americano NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas. Bancos similares estão

distribuídos em outros países, como o EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), mas todos trocam dados com o NCBI. O GenBank é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas as sequências de DNA disponíveis publicamente (sequências pequenas a genomas inteiros), além de RNA e proteínas.

Com o término da etapa de sequenciamento do gene rRNA 16S, a sequência de nucleotídeos é então comparada a outras de referência, depositadas em bancos de dados públicos ou privados para determinação de sua similaridade. MicroSeq, GenBank, Ribosomal Database Project – RDPII, Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms – RIDOM e o SmartGene são bancos de dados úteis, cada um com suas vantagens e limitações (PETTI, 2007).

A ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), integrada aos bancos genéticos, permite a busca, alinhamento e comparação entre sequências de DNA depositadas no banco (*subject*) e a sequência a ser avaliada (*query*). Atualmente, o BLASTn é considerado o “padrão ouro” no alinhamento de sequências de DNA (SUN et al., 2007).

Entre as modalidades disponíveis, o BLASTn é responsável pela comparação entre sequências de nucleotídeos nos bancos de dados de DNA. O resultado do algoritmo é uma pontuação (*Score*) para cada alinhamento analisado. Este valor é calculado a partir do número de espaços vazios (*gaps*) e substituições associadas a cada sequência alinhada (**Figura 4**).

O recurso mais importante do BLASTn é, justamente, o alinhamento em casos que as sequências estão incompletas ou necessitam de reajustes. Através da inserção ou exclusão de espaços nas sequências, é possível que sejam ajustadas, levando a tarefa de alinhamento a resultados mais significativos.

No GenBank, o índice *E-Value* (*Expect Value*) tem destaque pois representa um parâmetro de confiança do alinhamento (**Figura 4**). Ele fornece uma indicação da significância estatística daquele alinhamento e reflete a relação entre a quantidade de sequências que foram procuradas e o sistema de pontuação utilizado. Quanto menor o seu valor, maior será sua significância (MADDEN, 2002).

```

>gb|JF708942.1| Pseudomonas aeruginosa strain IRMD-2010 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1506

Score = 2598 bits (2880), Expect = 0.0
Identities = 1450/1455 (99%), Gaps = 1/1455 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CAGAT-GAACGCTGGCGGAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGC 59
Sbjct 18 CAGATTGAACGCTGGCGGAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGC 77
Query 60 TCCTGGATTCAAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGAT 119
Sbjct 78 TCCTGGATTCAAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGAT 137
Query 120 AACGTCCGAAACGGCGCTAACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 179
Sbjct 138 AACGTCCGAAACGGCGCTAACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 197
Query 180 GGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTA 239
Sbjct 198 GGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTA 257
Query 240 CCAAGGCAGCAGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGTGAGACAC 299
Sbjct 258 CCAAGGCAGCAGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGTGAGACAC 317
Query 300 GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGAT 359
Sbjct 318 GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGAT 377
Query 360 CCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGTCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG 419
Sbjct 378 CCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGTCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG 437
Query 420 AAGGGCAGTAAGTTAACCTTGTGTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAA 479
Sbjct 438 AAGGGCAGTAAGTTAACCTTGTGTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAA 497
Query 480 CTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAGCTTAATCGGAATTACTGGCG 539
Sbjct 498 CTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAGCTTAATCGGAATTACTGGCG 557
Query 540 TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGCTAACCTGGAA 599
Sbjct 558 TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGCTAACCTGGAA 617
Query 600 CTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGATTCTGTGAATT 659
Sbjct 618 CTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGATTCTGTGAAGCG 677

```

Figura 4 - Alinhamento entre duas sequências de DNA no GenBank. *Gaps* e substituição de nucleotídeos indicadas por setas vermelhas, *Expect Value* em vermelho.

Fonte: (Autor, 2011).

Os resultados das análises são geralmente exibidos em percentagem de identificação. Isto se refere à quantidade de nucleotídeos idênticos entre a sequência a ser examinada e a sequência de referência, divididas pelo número de nucleotídeos sequenciados. Para a maioria dos taxonomistas, o escore de percentagem de identificação aceito é $\geq 97\%$ e $\geq 99\%$ para classificar um microrganismo em gênero e espécie, respectivamente (PETTI, 2007).

2.7 Vantagens da Análise do Gene rRNA 16S

Os laboratórios de microbiologia clínica de rotina, que utilizam somente métodos fenotípicos para diagnóstico, estão sujeitos a falhas na identificação das espécies bacterianas. Estas falhas ocorrem devido a características inerentes ao microrganismo, como fenótipo atípico, espécies raras, difícil cultivo ou limitações da própria técnica. Maior dificuldade é observada em laboratórios de poucos recursos, pois são necessárias extensas séries de testes bioquímicos, podendo tornar o custo do diagnóstico inviável, e nem sempre chegando a uma conclusão.

Segundo Bosshard et al. (2003), apenas uma minoria dos laboratórios clínicos que isolam bacilos Gram positivos (BGP), identificam-nos corretamente através dos métodos convencionais. Em aproximadamente metade dos casos, não é possível definí-los nem em nível de gênero. Em 136 cepas de BGP analisadas por testes fenotípicos, 52,2% foi determinada em gênero e o restante não foi possível discriminar em nenhum nível taxonômico. No entanto, analisando-os através do gene rRNA 16S, 65,4% foram determinados em espécie, 31,6% em gênero e o restante em família.

Algumas espécies de estreptococos do grupo *viridans* estão mais relacionadas a causar endocardite que outras. No entanto, a identificação fenotípica é difícil e sujeita a erros. Nestes casos, a análise da sequência de rRNA 16S fornece identificação acurada à nível de espécie, podendo evidenciar a importância clínica do microrganismo isolado (CLARRIDGE, 2004).

O diagnóstico de endocardite bacteriana é normalmente fácil em pacientes com bacteremia contínua, sintomatologia e presença de alterações específicas no eletrocardiograma. Apesar de numerosas situações clínicas conduzirem à suspeita de endocardite, as culturas e exames histológicos podem não confirmar o diagnóstico. A febre é o achado clínico mais comum, mas pode estar ausente em idosos e pacientes em terapêutica antimicrobiana (BROUQUI e RAOULT, 2001). As culturas negativas têm sido observadas em 2,5 a 31% dos pacientes com endocardite. Na maioria dos casos, a utilização de antimicrobianos antes da coleta de amostra e a dificuldade de crescimento do microrganismo nos meios artificiais de cultura de sangue é que resultam em culturas negativas (NABER e ERBEL, 2003).

Os métodos com bases moleculares apresentam grande utilidade como ferramenta diagnóstica rápida e adicional para detecção, particularmente de bactérias fastidiosas. Gatselis

et al. (2006) relatam o uso do gene rRNA 16S por PCR de amplo espectro direto da amostra de hemocultura, num paciente com endocardite infecciosa, definindo a fastidiosa *Cardiobacterium hominis* como agente etiológico em apenas 2 dias após a incubação da cultura sanguínea. O microrganismo foi isolado por métodos convencionais somente após 17 dias de incubação.

As micobactérias apresentam em geral, crescimento lento ou de difícil identificação. Sondas de ácidos nucléicos e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) são dois métodos com maior sensibilidade e especificidade que estão substituindo os tradicionais e lentos testes bioquímicos. Entretanto, para testes conclusivos há a necessidade de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFC. A análise do sequenciamento do gene rRNA 16S promove uma melhor caracterização e diagnóstico, pois permite a detecção com um pequeno volume de amostra (CLOUD et al., 2002).

Segundo estudos de Nakano et al. (2010) sobre a dificuldade no isolamento e identificação de micobactérias a partir de amostras de tecido muscular-esquelético, observou que o sequenciamento direto do gene rRNA 16S trata-se de uma técnica de grande utilidade para o diagnóstico e identificação do microrganismo. A identificação exata do microrganismo é de suma importância, pois as infecções nestes pacientes requerem desbridamento cirúrgico e tratamento antimicrobiano direcionado.

Na década de 90, os métodos moleculares já indicavam sua grande utilidade para a identificação de isolados bacterianos que são de difícil determinação fenotípica. O reconhecimento da *Bartonella henselae*, agente causador da angiomatose bacilar, e a descoberta de *Tropheryma whippelii*, bacilo considerado incultivável, associado à doença de Whipple, demonstram o avanço da tecnologia (RELMAN et al., 1990; RELMAN et al., 1992). Perfil fenotípico ambíguo, em laboratórios clínicos, representa caracterização incerta e provável erro na identificação.

Segundo Petti et al. (2005), a análise do rRNA 16S é uma ferramenta mais objetiva, não sofrendo influência de variações fenotípicas dos microrganismos, tendo o potencial de reduzir os erros laboratoriais. Em seus estudos, três pacientes que tiveram endocardite foram analisados por métodos convencionais, sendo isolados os microrganismos *Facklamia* sp., *Eubacterium tenue* e *Bifidobacterium* sp. Através da análise do gene 16S foram identificados os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Cardiobacterium valvarum*, e *Streptococcus mutans*, respectivamente. Concluíram que a identificação convencional estava errada e pode

ter desorientado a equipe médica, resultando em mau prosseguimento dos cuidados ao paciente.

A análise do gene rRNA 16S pode conduzir à descoberta e descrição de novas espécies de interesse clínico. Este método molecular também pode identificar bactérias incultiváveis, independentemente de condições de crescimento. Só em 2003, o *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* divulgou cerca de 300 novas espécies através da sequência do gene rRNA 16S (CLARRIDGE, 2004).

Durante 5 anos de estudo, Drancourt et al. (2004) analisaram através do gene 16S, 1.404 bactérias isoladas de pacientes internos num hospital, as quais não foi possível a identificação por critérios fenotípicos. Foram identificadas 120 espécies bacterianas raras, sendo 11 consideradas novas espécies.

O grupo de Hauschild e colaboradores ao estudar espécies de *Staphylococcus sciuri* se deparou com cinco isolados que apresentavam diferenças bioquímicas importantes. Após análise da sequência dos genes 16S, *rpoB* e *dnaJ* que indicavam ser *S. sciuri*, mas com similaridade a *S. fleurettii*, seguiu-se a análise com hibridização DNA-DNA, sugerindo ser uma nova espécie, que foi denominada *Staphylococcus stepanovicii* (HAUSCHILD, STEPANOVIC e ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, 2010).

Lee et al. (2010) estudaram um microrganismo não identificável por métodos microbiológicos convencionais, isolado de um paciente diabético com septicemia. A análise do gene 16S revelou que o isolado pertencia ao gênero *Neisseria*. Após análises fenotípicas e genéticas foi proposto que se tratava de uma nova espécie, sendo então denominada *Neisseria skkuensis*.

As bactérias *Burkholderia pseudomallei* e *B. mallei* são os agentes causadores da melioidose e do mormo, respectivamente. Fazem-se necessários para o seu diagnóstico: a observação colonial e morfológica da célula, e uma série extensiva de testes bioquímicos que podem resultar em mais de sete dias para o término das análises. Em regiões endêmicas, esses testes são normalmente realizados, porém em regiões onde são raramente encontrados, há a possibilidade de erro na identificação. A análise do 16S permite uma rápida identificação e diferenciação entre os microrganismos (GEE et al., 2003).

O sequenciamento e análise do gene rRNA 16S permanece como “padrão ouro” para identificação da grande maioria das bactérias. Vários estudos demonstram que comparando-se os testes fenotípicos com a identificação por sequenciamento, esta é considerada superior principalmente para isolados com perfil bioquímico atípico, crescimento lento, espécies raras

e microrganismos incultiváveis (CLARRIDGE, 2004; CHAKRAVORTY et al., 2007; PETTI, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar as bactérias patogênicas isoladas de pacientes internados na Unidade de Emergência do Agreste-AL, através da técnica de PCR de amplo espectro e análise do sequenciamento do gene rRNA 16S, no período de março de 2008 a março de 2010

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil geral dos pacientes internados na Unidade de Emergência do Agreste com confirmação ou suspeita de infecção hospitalar;
- Identificar as bactérias causadoras de infecção hospitalar;
- Definir a frequência de administração empírica de antimicrobianos;
- Determinar o padrão de resistência das bactérias aos antimicrobianos;
- Comparar o perfil de resistência aos antimicrobianos com dados de programas de vigilância nacionais e internacionais;
- Detectar os mecanismos de resistência ESBL, AmpC, resistência à meticilina e ao grupo MLS dos isolados clínicos;
- Realizar uma triagem molecular através de PCR, sequenciamento do gene rRNA 16S e análise em bancos genéticos para identificação das bactérias;
- Comparar os resultados dos bancos genéticos GenBank e Ribosomal Database Project II, em relação aos microrganismos sequenciados;
- Avaliar a presença de espécimes bacterianos raros, ainda não descritos na literatura e/ou espécimes emergentes;
- Criar uma bacterioteca para armazenamento dos isolados clínicos.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa, os pacientes internados na Unidade de Emergência do Agreste de Alagoas com suspeita ou confirmação para infecção hospitalar, seguindo as recomendações estabelecidas na Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), definindo infecção hospitalar como “aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”.

A ANVISA estabelece critérios para diagnóstico de infecção hospitalar, seguindo os princípios: que o diagnóstico das infecções hospitalares deverá valorizar informações oriundas de evidência clínica, derivada da observação direta do paciente ou da análise de seu prontuário; resultados de exames de laboratório, ressaltando-se os exames microbiológicos, a pesquisa de antígenos, anticorpos e métodos de visualização realizados; evidências de estudos com métodos de imagem; endoscopia; biópsia e outros.

Como critérios gerais são considerados como infecção hospitalar quando, na mesma topografia em que foi diagnosticada infecção comunitária, tiver sido isolado um germe diferente, seguido do agravamento das condições clínicas do paciente; quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convencionar-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão; e são também convencionadas infecções hospitalares aquelas manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo, os pacientes caracterizados com infecção do tipo comunitária, segundo os critérios da ANVISA.

4.3 Local de Estudo

O estudo foi realizado no hospital de atendimento a politraumatizados, a Unidade de Emergência Dr. Daniel Houly, também conhecida por Unidade de Emergência do Agreste – UEA. Localiza-se no município de Arapiraca, interior do Estado de Alagoas, sendo referência no atendimento a casos de trauma na região do sertão, agreste e baixo São Francisco.

Trata-se de um hospital público de pequeno porte, vinculado ao ensino e conveniado à Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL e à Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Conta com um total de 61 leitos distribuídos em 01 Unidade de Terapia Intensiva Geral, 08 Enfermarias para Internação (Clínica Médica) e 05 Enfermarias para Emergência/Observação. Os locais selecionados para realização do estudo foram a UTI Geral e as Enfermarias para Internação.

4.4 Local de Análise das Amostras

As amostras coletadas na UEA foram analisadas no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica – LABMEG, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL no Campus Arapiraca.

4.5 Origem dos Dados

Os dados do estudo têm origem de duas fontes:

Coleta de dados da CCIH: os dados foram coletados a partir de informações provenientes dos prontuários dos pacientes internados, por exames microbiológicos realizados na UEA, assim como fichas de notificação do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, dos quais foram avaliados os microrganismos isolados e o uso dos antimicrobianos profiláticos e terapêuticos durante a permanência do paciente no ambiente hospitalar. Informações gerais dos pacientes também foram coletadas, como idade, sexo, motivo base de sua internação, setor de internação, tempo de internação, utilização de procedimentos invasivos e tempo de uso de sonda vesical de demora.

Coleta de amostras clínicas: foram coletadas amostras clínicas de pacientes internados no setor de Internação ou na UTI Geral da UEA, com caso suspeito ou confirmado para infecção hospitalar através de busca ativa. Os pacientes foram selecionados a partir de informações oriundas da análise de seu prontuário, assim como a observação direta de evidências clínicas nestes pacientes. Informações gerais desses pacientes, semelhantes às coletadas na CCIH, também foram coletadas para composição do perfil epidemiológico.

4.6 Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas sob o número 014852/2006-29.

4.7 Termo de Consentimento

O paciente e/ou seu responsável foram esclarecidos sobre o estudo e a coleta do material somente foi realizada quando concordaram em participar do mesmo (**Apêndice A**).

4.8 Análise Microbiológica

4.8.1 Coleta de Amostras e Cultivo Primário

A coleta microbiológica foi realizada através de busca ativa dos casos de infecção, por observação direta dos pacientes e análise de prontuário, quando este evidenciava características sugestivas de quadros infecciosos ou mesmo a própria solicitação médica para exame microbiológico.

4.8.1.1 Urocultura

Os pacientes selecionados para realização de cultura bacteriológica de urina foram aqueles que estavam em uso de procedimentos potencialmente infecciosos (invasivo) ou apresentaram indícios de infecção, como disúria, frequência miccional, piúria em sumário de urina, utilização de sonda vesical de demora (SVD) a mais de cinco dias, urina com aspecto concentrado em bolsa coletora ou produção de exsudato purulento na genitália externa. A coleta de urina para cultura microbiológica foi realizada através da coleta por jato médio ou sonda de alívio. Após a higienização da região genital, a amostra de jato médio de urina foi colhida, desprezando-se o primeiro jato e colocando o restante em recipiente estéril.

A coleta por sonda vesical foi realizada pinçando-se a cânula do coletor, seguida de desinfecção e punção por agulha e seringa estéreis, colocando-se até 10 mL de urina em recipiente estéril. O transporte das amostras foi realizado em temperatura ambiente, sendo processadas em até 1 hora. Depois de homogeneizadas, as amostras foram cultivadas em Agar CLED e MacConkey, através da técnica de semeadura semiquantitativa em placa, com alça calibrada de 0,001 mL. Foram incubadas em estufa a $35\pm1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Foi retirado 10 μL da urina em lâmina para visualização por microscopia óptica a fresco e outra alíquota para coloração de Gram.

A presença de 100.000 UFC/mL ou superior em meio de cultura, é sugestiva de infecção do trato urinário, principalmente se associada à piúria e disúria e/ou frequência

urinária. A urina proveniente de paciente em uso de sonda vesical de demora foi considerada infecção, quando na presença de 50.000 UFC/mL em placa. Foram consideradas contaminação em decorrência de coleta, amostras apresentando muitas células epiteliais por campo em microscopia, ou mais de dois tipos bacterianos em semeadura. Colônias fúngicas sugestivas de leveduras foram confirmadas através de microscopia óptica a fresco em solução salina estéril.

4.8.1.2 Exsudato Purulento de Feridas

A cultura microbiológica foi realizada em pacientes que apresentavam ferida superficial, profunda ou operatória, aguda (derivada de processos cirúrgicos, queimaduras, lacerações) ou crônica (ocasionada por processos de pressão – escara ou outros processos) com produção de exsudato purulento. O excesso de exsudato purulento foi removido através do uso de solução fisiológica estéril, sendo então obtida a amostra através de *swab* e armazenamento em tubo “seco” estéril (sem meio de transporte), procedendo-se o semeio logo em seguida; ou *swab* com meio de transporte Stuart, em temperatura ambiente até 24 horas após a coleta.

As amostras foram cultivadas em Agar Sangue e MacConkey, através da técnica de semeadura por esgotamento em placa, e uma lâmina para a coloração de Gram foi confeccionada. Após semeio em placa, o *swab* foi posto em caldo BHI (*Brain-Heart-Infusion*). Foram incubadas em estufa a $35\pm1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. As placas contendo Agar Sangue foram incubadas pelo método da jarra com vela por tempo e temperatura semelhantes.

4.8.1.3 Aspirado Traqueal

Pacientes em uso de respirador, com presença de exsudato purulento no trato respiratório inferior, foram submetidos à coleta de aspirado traqueal por profissional fisioterapeuta ou enfermeiro. O exsudato foi obtido através de aspiração com cânula pela traqueostomia, sendo cortado 5 cm da extremidade terminal da cânula e inserida em recipiente

estéril para análise. As amostras foram cultivadas em Agar Sangue e MacConkey, através da técnica de semeadura por esgotamento em placa, e uma lâmina para a coloração de Gram foi confeccionada. Foram incubadas em estufa a $35\pm1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. As placas contendo Agar Sangue foram incubadas pelo método da jarra com vela por tempo e temperatura semelhantes. Foi considerada positiva aquela amostra acima de 10^6 UFC/mL.

4.8.1.4 Hemocultura

As coletas de sangue para hemocultura foram realizadas em pacientes suspeitos de septicemia, através da observação de leucocitose por neutrofilia em hemograma, febre e/ou uso de dispositivos vasculares. As amostras de sangue para cultura foram coletadas por punção venosa em sítios diferentes com seringa e agulha estéreis, e adequada anti-sepsia. As coletas foram feitas, preferivelmente durante a ascensão da temperatura e antes da antibioticoterapia, procurando-se evitar o pico febril do paciente e a interferência da administração de antimicrobianos no crescimento da cultura.

O volume de sangue retirado, de aproximadamente 8 a 10 mL para adultos e 1 a 5 mL em crianças, totalizando 2 a 3 frascos por paciente, foi inoculado em recipiente contendo meio adequado para hemocultura, e transportado à temperatura ambiente até 3 horas, após a coleta. As hemoculturas foram incubadas por cinco dias em estufa a $35\pm1^{\circ}\text{C}$, com 02 subcultivos, sendo o primeiro ao término de 24h de incubação, e o outro, no último dia de incubação. O semeio foi realizado no meio de cultura Agar Sangue pelo método da jarra com vela.

4.8.2 Análise Fenotípica Básica

Após incubação e crescimento das colônias em meio de cultura, os microrganismos foram avaliados fenotípicamente para direcionamento do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Foram realizados testes como microscopia a fresco, observação das características morfológicas das colônias, coloração de Gram, teste da catalase, teste da coagulase, fermentação da glicose/lactose e teste da oxidase.

4.8.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

O método utilizado para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi o de Kirby-Bauer ou Disco-Difusão. Consiste na colocação de discos impregnados com concentração padronizada do antimicrobiano sobre uma placa de Agar Mueller-Hinton, previamente semeada com uma suspensão do microrganismo em solução fisiológica estéril até se obter turvação de 0,5 na escala *Mac Farland*, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após incubação de 18 a 24 horas, o halo de inibição foi medido e interpretado como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2009).

Métodos fenotípicos de triagem foram empregados para detecção de resistência aos antimicrobianos, sendo utilizados para as ESBL, discos combinados (contendo inibidores de beta-lactamases) e aproximação de discos, formando uma zona de inibição característica conhecida por “zona fantasma”. Os discos utilizados para avaliação foram: amoxicilina+clavulonato (AMC), ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), aztreonam (ATM) e ceftriaxona (CRO) com distância entre os discos de 20mm, como visualizados na **Figura 5** (BAUERNFEIND, CHONG e SCHWEIGHART, 1989; ROSSI e ANDREAZZI, 2004). O disco de imipenem (IMP) também foi posicionado para observação de coprodução de ESBL e AmpC.

As beta-lactamases do tipo AmpC foram evidenciadas pelo teste de resistência induzível (D-teste), através dos discos de cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP) e aztreonam (ATM), com distância entre os discos de 25 mm (CORMICAN, MARSHALL e JONES, 1996; LIVERMORE e BROWN, 2001; ROSSI e ANDREAZZI, 2004; NCCLS, 2005). Esquema na **Figura 5**.

Discos de cefoxitina de 30 µg foram empregados como marcadores para resistência dos estafilococos à meticilina. A resistência ao grupo MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B), importantes opções terapêuticas no tratamento de infecções estafilocócicas, foram detectadas através da aproximação de discos (D-teste) de clindamicina e eritromicina, em 20mm de distância (ROSSI e ANDREAZZI, 2004; NCCLS, 2005).

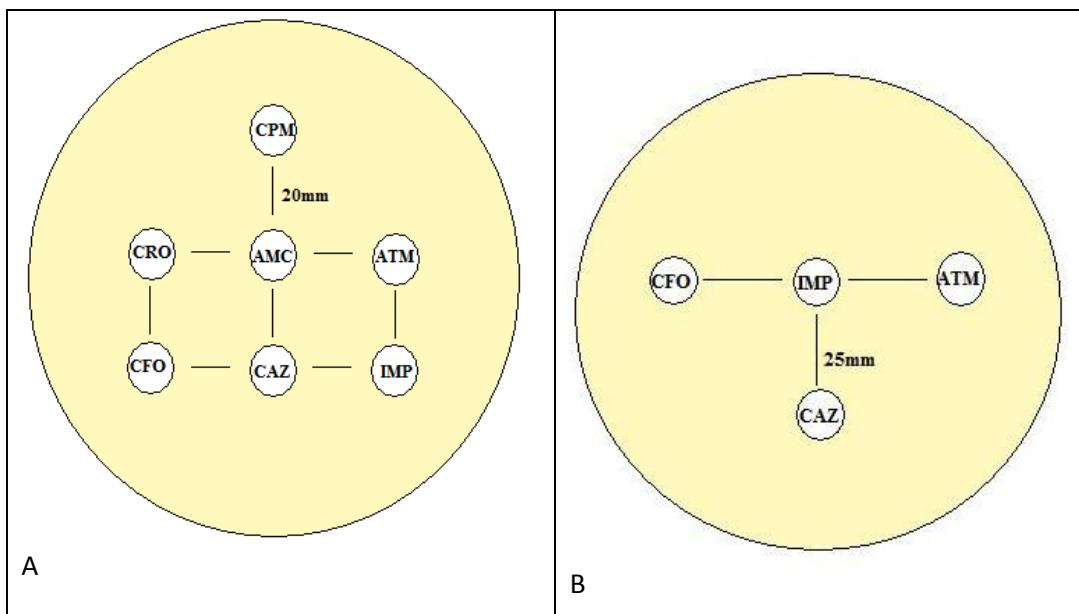


Figura 5 - Esquema para detecção de fenótipos de resistência para ESBL e AmpC. **A** – arranjo para detecção de ESBL, **B** – arranjo para detecção de AmpC.

4.9 Análise Molecular

4.9.1 Extração de DNA

Colônias bacterianas obtidas de isolados clínicos foram submetidas à extração de DNA, utilizando protocolo clássico a partir do *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL et al., 2003). Duas a três colônias bacterianas da mesma amostra foram inoculadas em caldo de cultura BHI estéril. Após incubação em estufa a $35\pm1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24h, a cultura foi transferida para microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 10.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (centrifugado) foi ressuspêndido por inversão em 570 μL de água MilliQ. Foram adicionados 30 μL de SDS a 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) e 3 μL de proteinase K para lise da parede celular e digestão de proteínas. Após homogeneizar e incubar a reação por 1h a 37°C , adicionou-se 100 μL de NaCl 5M homogeneizando inteiramente.

A extração foi realizada através do uso de CTAB (Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide), adicionando-se 80 μL de CTAB NaCl, misturando-os por inversão, seguida de

incubação a 65°C por 10 min. Neste processo há a formação de complexos, tanto de polissacarídeos presentes na parede celular de bactérias, como proteínas residuais do processo de extração. Estas moléculas contaminantes são removidas em 2 extrações: com a adição de 800 µL de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1, sendo misturados e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min; a fase aquosa é removida para um novo tubo e em seguida a outra extração com o uso de igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico 25:24:1, também sendo misturados e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min.

Após transferir o sobrenadante para um novo tubo (1,5 mL), a precipitação dos ácidos nucléicos foi realizada adicionando-se 0,6 volume de isopropanol, misturando por inversão e centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Descartando-se o isopropanol por inversão do tubo, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seguido de outra centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Posteriormente o etanol foi desprezado, retirando-se o excesso ao colocar o microtubo em banho seco a 60°C, sem deixar o *pellet* ressecar. Ao final, o *pellet* foi ressuspensido em 100 µL de água MilliQ e a amostra estocada a -20°C.

4.9.2 PCR de Amplo Espectro e Eletroforese

Para a reação de PCR de amplo espectro, foi selecionado o par de iniciadores 16Sf 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA-3' (iniciador direto, localizado nas posições 8 a 27) e 16Sr 5'-ACGGCGACTGCTGGCAC-3' (iniciador reverso, posições 531 a 514) (GATSELIS et al., 2006). Estes iniciadores delimitam a região inicial do gene rRNA 16S de bactérias permitindo a amplificação parcial do gene. As sequências dos oligonucleotídeos foram submetidas a alinhamentos no programa BLASTn (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), para confirmação de suas homologias com espécies bacterianas. Além das análises com BLASTn, foi utilizado o software GENERUNNER, versão 3.05 (disponível em <http://www.generunner.net/>) para análise de estruturas terciárias e dímeros formados pelas moléculas dos iniciadores.

A reação de PCR para amplificação parcial do gene rRNA 16S foi realizada com os reagentes e volumes descritos na **Tabela 1**, com volume total de 25 µL por reação.

Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador automático, modelo MJ96 (Biocycler) e consistiram de uma incubação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de

desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho do amplicon esperado foi de aproximadamente 500 pares de base.

Tabela 1 - Protocolo de reação de PCR para amplificação parcial do gene rRNA 16S com os iniciadores 16Sf e 16Sr.

Componentes	Volume na Reação	Concentração Final
H ₂ O ultrapura estéril	19,15 µL	-
Tampão (10x)	2,5 µL	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µL	1,5 mM
Mistura de dNTP (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM
Iniciador 16Sf (10 pmol/µL)	0,5 µL	0,2 pmol/µL
Iniciador 16Sr (10 pmol/µL)	0,5 µL	0,2 pmol/µL
Taq polimerase (5 U/µL)	0,1 µL	0,02 U/µL
DNA (50 ng/µL)	1,0 µL	2 ng/µL
Volume total	25 µL	

Fonte: (Autor, 2011).

4.9.3 Purificações e Reação de Sequenciamento

Para purificação da reação de PCR foi adicionado 72 µL de isopropanol 65% diretamente aos microtubos do amplicon, sendo homogeneizados e incubados 20 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min, sendo o isopropanol descartado por inversão. Foi adicionado 250 µL de etanol 60% com nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Após descartar o sobrenadante e secar o *pellet*, este foi ressuspensido em 20 µL de água MilliQ. Protocolo adaptado do *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL et al., 2003).

Uma alíquota da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% para visualização e quantificação do DNA purificado.

A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo aproximadamente 10 ng/µL do produto da PCR, 2 µL de Big Dye Mix (Applied Biosystems), 2 µL de Save Money 5.0X (Applied Biosystems) e 2 pmol de iniciador direto ou reverso (16Sf ou 16Sr). As amostras foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10

segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 min, em termociclador automático.

As amostras foram novamente purificadas, adicionando-se 72 µL de isopropanol 65% sendo homogeneizadas e incubadas 20 min em temperatura ambiente, protegidas de luminosidade. A seguir foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min, sendo o isopropanol descartado por inversão. Foi adicionado 250 µL de etanol 60% com nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Após descartar o sobrenadante e secar o *pellet*, este foi ressuspensido em 20 µL de Formamida HI-DI, sendo armazenado a -20°C, protegido da luminosidade.

As amostras foram submetidas a sequenciamento automático nos equipamentos ABI PRISM 310 e ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

4.9.4 Análise das Sequências nos Bancos Genéticos e Atribuição de Identificação

Os eletroferogramas gerados foram analisados quanto à qualidade de sequências em programa Sequencher 4.8, através de análise automática e observação visual direta. A seguir, a sequência FASTA foi extraída para realização de alinhamento nos bancos genéticos. Os microrganismos com sequências de má qualidade foram submetidos a novo sequenciamento.

As sequências de rRNA 16S geradas foram então analisadas contra os bancos de dados públicos disponíveis, o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e o Ribosomal Database Project II (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), através da ferramenta BLASTn. Como critério para atribuição de identificação aos microrganismos, as sequências de amostras ambientais, não-cultivadas ou de má qualidade, depositadas nos bancos genéticos, foram excluídas da busca através da seleção das opções disponíveis no próprio site dos bancos genéticos.

O parâmetro escolhido para atribuir identificação aos microrganismos sequenciados foi a partir da avaliação do índice *Max Ident*, quando $\geq 99\%$ para a determinação em nível de espécie e $\geq 97\%$ em nível de gênero. Outros índices também foram considerados para certificar a avaliação, como o *Max Score* e *S_ab Score* através de suas melhores pontuações e os resultados do *E-Value* considerado 0.0 (zero) ou mais próximo possível deste (PETTI, 2007).

4.9.5 Alinhamento Múltiplo e Edição de Sequências

A edição e análise das sequências alinhadas foi realizada através do software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3, que tem interface gráfica para manipulação de outros programas (HALL, 1999). O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado através do programa CLUSTALW, presente no BioEdit, utilizando a configuração padrão dos algoritmos (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994). Para criação de sequências consenso, foram utilizadas sequências de referência no GenBank para os microrganismos não determinados pelo BLASTn (**Apêndice B**). Os critérios para seleção das sequências foram: espécies com genoma completo sequenciados ou sequências publicadas em periódicos relevantes, evitando assim aquelas sequências submetidas diretamente ao GenBank, mais suscetíveis a erro. Somente para a sequência consenso de *K. granulomatis*, não foi utilizado o critério anterior, pois não havia no GenBank genoma completo desta espécie ou sequências publicadas em periódicos.

4.10 Bacterioteca

Os isolados bacterianos foram preservados em freezer a -80°C para futuras análises. Esta metodologia permite a preservação dos microrganismos por longos períodos de tempo. O crioprotetor escolhido foi o skin-milk, amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa devido à observação de bons resultados e a facilidade de obtenção da matéria-prima para o procedimento (OPLUSTIL, ZOCCOLI e TOBOUTI, 2004). Microtubos de 2 mL, contendo 0,5 mL de crioprotetor foram esterilizados através de autoclavação a 110°C por 15 min. Foram conservados em geladeira (4°C) até o semeio, então armazenados em temperatura ultra baixa.

4.11 Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados no trabalho foram: média, mediana e desvio padrão; teste de X^2 , Mann-Whitney e teste T de *Student*. O nível de significância estatística escolhido foi de 0,05 (valor de p). Os testes foram calculados com auxílio dos softwares Excel 2007, Epi Info 3.5.1 e BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Características sobre a Internação dos Pacientes

Durante os dois anos de período de estudo, amostras biológicas foram coletadas de 271 pacientes com presença ou suspeita de IH. Destes pacientes, 154 (57%) apresentaram pelo menos uma cultura positiva durante o tempo que permaneceram internados.

Na **Tabela 2**, os dados de internação dos pacientes podem ser observados, além da presença (isolamento) de microrganismos a partir de culturas microbiológicas através dos resultados das culturas como positiva ou negativa.

A média de idade dos pacientes internados foi de 36 ± 18 anos e o sexo masculino foi o mais predominante com 227 (83,8%) casos. Acidentes automobilísticos (47,2%) e perfurações por arma de fogo (15,9%) foram os principais motivos pelos quais os pacientes foram internados.

Quanto ao setor de internação, 192 (70,8%) pacientes encontravam-se internados nas Enfermarias de clínica médica, enquanto 79 (29,2%) estavam na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os pacientes internados nas Enfermarias (61,5%) exibiram maior número de isolamento de patógenos (cultura positiva) do que aqueles provenientes da UTI (45,6%)[p=0,027].

O tempo de internação dos pacientes também foi analisado quanto ao isolamento de microrganismos (resultado das culturas). A mediana do tempo de internação desses pacientes foi de 26 dias, sendo 36 dias em pacientes com cultura positiva na UTI e 28 dias para aqueles nas Enfermarias, ambos com diferenças significativas para aqueles com cultura negativa (p=0,007 e p=0,002).

Entre os procedimentos invasivos em uso pelo pacientes internados, observados nos dias das coletas microbiológicas, o uso de cateter vascular (70,5%), cirurgia recente (58,7%) e sonda vesical de demora (58,3%) foram os mais frequentes.

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes internados na UEA e o isolamento de microrganismos em cultura.

Parâmetros	Total (%)	Cultura Positiva (%)	Cultura Negativa (%)	P-valor
Pacientes internados	271	154 (56,8)	117 (43,2)	-
Sexo masculino	227 (83,8)	126 (55,5)	101 (44,5)	0,319
Idade (anos) ^a	35,9±17,9	36,2±17,4	35,6±18,7	0,810
Motivo da internação				
Acidente automobilístico	128 (47,2)	74 (57,8)	54 (42,2)	0,806
Perfuração por arma de fogo	43 (15,9)	23 (53,5)	20 (46,5)	0,629
Queda da própria altura	23 (8,5)	12 (52,2)	11 (47,8)	0,801
Queimaduras	13 (4,8)	9 (69,2)	4 (30,8)	0,523
Queda de altura	12 (4,4)	4 (33,3)	8 (66,7)	0,166
Perfuração por arma branca	9 (3,3)	4 (44,4)	5 (55,6)	0,506
Vítima de agressão	5 (1,8)	5 (100)	0 (0,0)	0,071
Contato com animal	3 (1,1)	3 (100)	0 (0,0)	0,261
Intoxicação exógena	3 (1,1)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,579
Mergulho/afogamento	3 (1,1)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,579
Outros	20 (7,4)	13 (65,0)	7 (35,0)	0,490
Não informados	9 (3,3)	5 (55,6)	4 (44,4)	1,000
Setor de Internação				
UTI	79 (29,2)	36 (45,6)	43 (54,4)	0,027
Enfermaria	192 (70,8)	118 (61,5)	74 (38,5)	-
Tempo de Internação (dias) ^b				
Todos	26 (16-42)	31 (19-51)	21 (14-32)	<0,001
UTI	30 (18-50)	36 (26-54)	25 (14-45)	0,007
Enfermaria	24 (15-38)	28 (17-45)	21 (15-29)	0,002
Procedimentos Invasivos				
Não fez uso de proc. invasivo	19 (7,0)	13 (68,4)	6 (31,6)	0,343
Fez uso de proc. invasivo	252 (93,0)	141 (56,0)	111 (44,0)	-
Cateter vascular	191 (70,5)	104 (54,5)	87 (45,5)	0,333
Cirurgia	159 (58,7)	89 (56,0)	70 (44,0)	0,336
Sonda vesical de demora	158 (58,3)	83 (52,5)	75 (47,5)	0,228
Traqueostomia	95 (35,1)	47 (49,5)	48 (50,5)	0,207
Sonda nasogástrica	87 (32,1)	47 (54,0)	40 (46,0)	0,311
Dreno	18 (6,6)	9 (50,0)	9 (50,0)	0,324
Alimentação parenteral	10 (3,7)	4 (40,0)	6 (60,0)	0,235

^a Para média± desvio padrão foi utilizado o teste t de Student.

^b A mediana foi calculada e comparada com o teste Mann-Whitney.

Outros testes foram calculados com X² e teste exato de Fisher.

Fonte: (Autor, 2011).

A **Tabela 3** evidencia a quantidade de culturas microbiológicas analisadas durante o estudo. Dos 271 pacientes internados que foram analisados, em 103 foram coletadas mais de uma amostra microbiológica, em períodos diferentes, resultando num total de 487 amostras.

Quanto ao total de amostras analisadas, houve isolamento de patógenos (cultura positiva) em 51,7% dos casos. As amostras provenientes de pacientes internados nas Enfermarias (58,6%) exibiram maior frequência de positividade do que a UTI (37%), com significativa diferença (p<0,001).

Tabela 3 - Análise das 487 amostras clínicas coletadas de pacientes internados quanto à presença de patógenos (cultura positiva).

Parâmetros	n (%)	Cultura Positiva(%)	Cultura Negativa(%)	P-Valor
Total de amostras	487	252 (51.7)	235 (48.3)	-
Setor de coleta				
Enfermaria	333 (68.4)	195 (58.6)	138 (41.4)	<0.001
UTI	154 (31.6)	57 (37.0)	97 (63.0)	-
Tipos de amostras				
Urina	258 (53.0)	88 (34.1)	170 (65.9)	<0.001
Exsudato purulento ferida	153 (31.4)	134 (87.6)	19 (12.4)	<0.001
Sangue	43 (8.8)	6 (14.0)	37 (86.0)	<0.001
Aspirado traqueal	19 (3.9)	17 (89.5)	2 (10.5)	<0.001
Líquor	9 (1.8)	6 (66.7)	3 (33.3)	0.506
Ponta de cateter	4 (0.8)	1 (25.0)	3 (75.0)	0.356
Líquido pleural	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (100)	0.482
Tempo de uso de SVD ^a	15.6±13.8	21.6±18.3	12.1±8.6	<0.001

SVD – sonda vesical de demora

^a Para média ± desvio padrão foi utilizado o teste t de *Student*.

Os outros testes foram calculados com χ^2 e teste exato de Fisher.

Fonte: (Autor, 2011).

As amostras de material biológico mais frequentemente coletadas foram: urina (53%) e exsudato purulento de feridas (31,4%). Apesar das amostras de urina serem as mais frequentes, somente 34,1% resultaram em culturas positivas.

As amostras microbiológicas que apresentaram maior positividade quanto à presença de patógenos, foram os exsudatos purulentos de feridas e as culturas de aspirado traqueal que exibiram 87,6% e 89,5% de frequência, respectivamente. Somente seis (14%) hemoculturas foram positivas quanto à presença de patógenos.

O tempo médio de uso de sonda vesical de demora foi de 15 dias. Houve diferença significativa do tempo médio de uso de SVD entre os pacientes com cultura negativa e cultura positiva ($p<0,001$). Entretanto quando os patógenos isolados foram avaliados, se bacterianos ou fúngicos, não houve diferença significativa entre os agentes causadores da infecção, como pode ser observado na **Figura 6**.

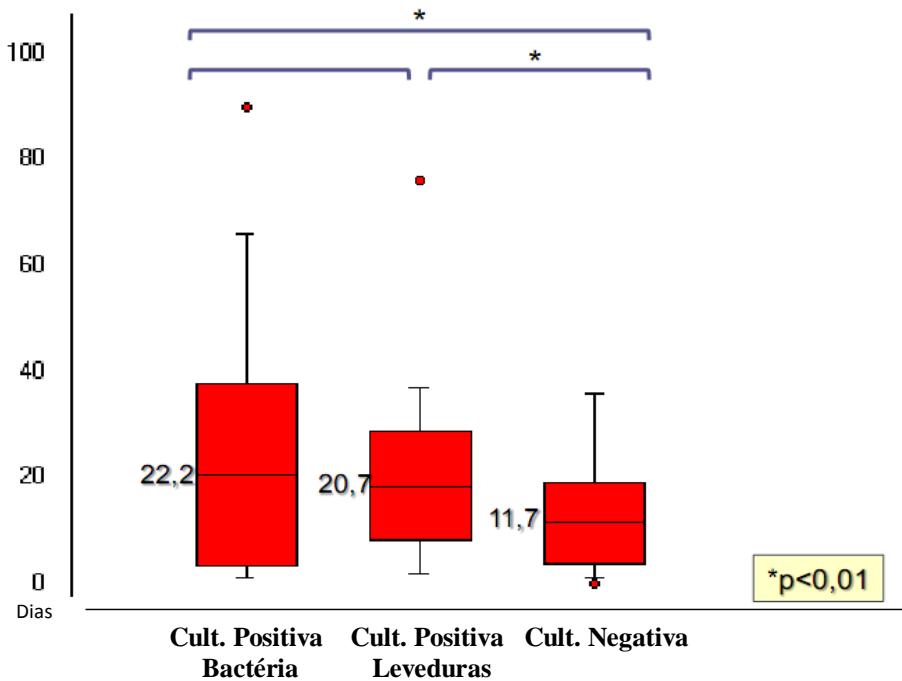


Figura 6 – Relação entre o tempo médio de uso de sonda vesical de demora e os resultados das culturas. Pacientes com cultura positiva para bactérias ou fungos permaneceram mais tempo internados. Foi utilizado o teste t de *Student*.
Fonte: (Autor, 2011).

5.2 Microrganismos Isolados

Em 43 das 252 culturas positivas foram isolados mais de um microrganismo. O total de microrganismos isolados foi de 269 bactérias e 26 leveduras. Os grupos de bactérias mais frequentes foram da família *Enterobacteriaceae* (fermentadores da glicose), correspondendo a 40,7%; seguidas dos não-fermentadores, 32,2%; o gênero *Staphylococcus* 12,6% e leveduras 8,8%, conforme pode ser observado na **Tabela 4**.

Os gêneros e espécies predominantes entre os bacilos Gram negativos foram: *Klebsiella* (18,6%) sendo *K. pneumoniae* a espécie mais frequente (8,1%); *Pseudomonas* (18,6%) com *P. aeruginosa* (16,9%); *Acinetobacter* (13,2%) com *A. baumannii* (12,9%), seguidos de *Enterobacter* (8,5%) e *Escherichia coli* (6,1%).

Tabela 4 - Distribuição de microrganismos por tipo de amostra. Informações provenientes da CCIH (UEA) e análise molecular do gene rRNA 16S (LABMEG) em bancos genéticos.

MICRORGANISMO	TOTAL n=295(%)	URINA n=92(%)	EXSU* ¹ n=173(%)	SANGUE n=6(%)	TRAQ* ² n=17(%)	OUTR* ³ n=7(%)
BACILOS GRAM NEGATIVOS	215(72.9)	60(65.2)	139(80.3)	1(16.7)	14(82.4)	1(14.3)
• Não-Fermentadores	95(32.2)	12(13.0)	71(41.0)	0	12(70.6)	0
<i>Acinetobacter</i>	39(13.2)	4(4.3)	31(17.9)	0	4(23.5)	0
<i>A. baumannii</i>	38(12.9)	4(4.3)	30(17.3)	0	4(23.5)	0
<i>Pseudomonas</i>	55(18.6)	8(8.7)	40(23.1)	0	7(41.2)	0
<i>P. aeruginosa</i>	50(16.9)	7(7.6)	37(21.4)	0	6(35.3)	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (0.3)	0	0	0	1(5.9)	0
• Fermentadores	120(40.7)	48(52.2)	68(39.3)	1(16.7)	2(11.8)	1(14.3)
<i>Enterobacter</i>	25(8.5)	11(12.0)	14(8.1)	0	0	0
<i>E. coli</i>	18(6.1)	12(13.0)	6(3.5)	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	55(18.6)	22(23.9)	30(17.3)	1(16.7)	1(5.9)	1(14.3)
<i>K. pneumoniae</i>	24(8.1)	8(8.7)	15(8.7)	0	1(5.9)	0
<i>Proteus</i>	6(2.0)	0	5(2.9)	0	1(5.9)	0
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	16(5.4)	3(3.3)	13(7.5)	0	0	0
COCOS GRAM POSITIVOS	49(16.6)	5(5.4)	31(17.9)	5(83.3)	2(11.8)	6(85.7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25(8.5)	1(1.1)	17(9.8)	5(83.3)	1(5.9)	1(14.3)
<i>Staphylococcus</i> CN* ⁴	12(4.1)	4(4.3)	7(4.0)	0	1(5.9)	0
<i>Streptococcus</i>	7(2.4)	0	2(1.2)	0	0	5(71.4)
<i>Enterococcus</i>	5(1.7)	0	5(2.9)	0	0	0
BACILOS GRAM POSITIVOS	5(1.7)	1(1.1)	3(1.7)	0	1(5.9)	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	3(1.0)	1(1.1)	2(1.2)	0	0	0
Outros	2(0.7)	0	0	0	1(5.9)	0
FUNGOS						
Leveduras	26(8.8)	26(28.3)	0	0	0	0

n – número de microrganismos isolados para cada tipo de amostra.

*¹ Exsudato purulento de feridas. *² Aspirado traqueal. *³ Outras culturas: líquor e ponta de cateter.

*⁴ CN – coagulase negativo

Fonte: (Autor, 2011).

Dos microrganismos isolados em uroculturas, 52,2% (48/92) das bactérias pertencem à família *Enterobacteriaceae*, revelando principalmente os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, e a espécie *E. coli*, como os mais frequentes. Leveduras foram observadas somente em uroculturas, correspondendo a 28,3% (26/92) do total de microrganismos isolados em urina.

As amostras de exsudatos purulentos de feridas exibiram predominância de bacilos Gram negativos (80,3%), sendo 41% (71/173) não-fermentadores e 39,3% (68/173) fermentadores. *P. aeruginosa* (21,4%) seguida por *A. baumannii* (17,3%) destacaram-se entre os mais frequentes. Entre os cocos Gram positivos, houve destaque para *S. aureus*, sendo mais frequentemente isolados nas amostras de exsudato purulento de feridas (17/25).

Das amostras de aspirado traqueal, em 70,6% (12/17) dos casos foram isolados microrganismos não-fermentadores, sendo *P. aeruginosa* (35,3%) e *A. baumannii* (23,5%), os mais frequentes.

Na **Tabela 5** pode ser observada a distribuição das 269 bactérias da UEA entre os setores de internação Enfermaria e UTI. A maioria das bactérias isoladas foi proveniente das Enfermarias, correspondendo a 78,4% (211/269). Quanto à classificação das bactérias pelo método de Gram, 215 foram Gram negativas, correspondendo a 79,9% (215/269), enquanto 54 foram Gram positivas, correspondendo a 20,1% (54/269). As bactérias Gram negativas foram predominantes tanto nas Enfermarias quanto na UTI, não havendo diferença significativa ($p=0,711$) nos setores analisados quanto às características tintoriais.

Tabela 5 - Distribuição das 269 bactérias por setor de internação.

MICRORGANISMOS	ENFERMARIA n=211 (%)	UTI n=58 (%)	P-VALOR
✓ CLASSIFICAÇÃO POR GRAM (cocos e bacilos)			
Gram negativos	167 (79.1)	48 (82.8)	0.711
Gram positivos	44 (20.9)	10 (17.2)	-
✓ PRINCIPAIS ISOLADOS POR GRUPOS			
Não Fermentadores	68 (32.2)	27 (46.6)	0.062
<i>Acinetobacter</i>	30 (14.2)	9 (15.5)	0.833
<i>Pseudomonas</i>	37 (17.5)	18 (31.0)	0.028
Fermentadores	99 (46.9)	21 (36.2)	0.179
<i>Enterobacter</i>	24 (11.4)	1 (1.7)	0.021
<i>Escherichia coli</i>	16 (7.6)	2 (3.4)	0.378
<i>Klebsiella</i>	42 (19.9)	13 (22.4)	0.713
<i>Staphylococcus</i>	30 (14.2)	7 (12.1)	0.830
<i>S. aureus</i>	19 (9.0)	6 (10.3)	0.798
<i>Staphylococcus</i> CN	11 (5.2)	1 (1.7)	0.471
Outros CGP* catalase negativos	9 (4.3)	3 (5.2)	0.725

CN – coagulase negativo

* CGP : cocos Gram positivos

Valor de p determinado por teste de X^2 e exato de Fisher.

Fonte: (Autor, 2011).

Apenas as espécies do gênero *Pseudomonas* e *Enterobacter* evidenciaram diferença estatística significante entre os setores de internação, sendo a primeira na UTI ($p=0,028$), e a segunda na Enfermaria ($p=0,021$). Para os demais microrganismos, não foi observada diferença estatisticamente significante quanto a sua presença nos setores analisados.

5.3 Administração Empírica de Antimicrobianos

A terapia antimicrobiana empírica ou presuntiva, aquela guiada contra o agente infeccioso mais provável naquele tipo de infecção sem o auxílio de antibiograma (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2004), foi analisada no prontuário dos pacientes internados na UEA.

Durante as coletas das 487 amostras, 114 (23,4%) foram provenientes de pacientes que não estavam em uso de terapia empírica antimicrobiana. A positividade em cultura para patógenos ocorreu em 50,7% dos casos. Apesar da maioria dos pacientes estar em uso de terapia antimicrobiana (76,6%), a positividade quanto à presença de patógenos (44,7%) não apresentou diferença significativa ($p=0,267$), como observado na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Perfil de utilização empírica de antimicrobianos em pacientes internados com suspeita ou diagnóstico de infecção, e a positividade para patógenos em cultura.

Utilização de antimicrobianos durante a coleta de amostras	n	(%)	%CP*	P-valor
Não usaram antimicrobianos	114	(23,4)	50,7	0,267
Fez uso de antimicrobiano(s):	373	(76,6)	44,7	-
Apenas 01 antimicrobiano	107	(22,0)	53,3	0,524
Associação de antimicrobianos	266	(54,6)	49,6	-

* %CP – Percentagem de culturas positivas para patógenos.

Valor de p determinado por teste de X^2 .

Fonte: (Autor, 2011).

Comparando-se as culturas positivas provenientes de pacientes que utilizaram monoterapia antimicrobiana (53,3%), com aqueles que utilizaram antimicrobianos em associação (49,6%), a diferença não foi significativa na positividade das amostras ($p=0,524$), em relação à quantidade de antimicrobianos que estavam sendo administrados.

Na **Tabela 7**, é possível observar os antimicrobianos que foram administrados aos pacientes internados na UEA durante as 487 coletas de amostras microbiológicas nesses pacientes. Os antimicrobianos mais frequentes foram: amicacina (26,9%); ceftazidima (21,1%); oxacilina (20,3%); clindamicina (19,9%) e a ceftriaxona (19,1%). O perfil de resistência dos microrganismos a esses antimicrobianos administrados aos pacientes revelou que, em 189 casos houve resistência de 74,6% aos mesmos antimicrobianos que o paciente fazia uso. A administração de cefalosporinas foi observada em 58,1% dos casos (dados não mostrados).

Os microrganismos isolados de pacientes que estavam em uso dos antimicrobianos listados na **Tabela 7**, evidenciaram elevada resistência, destacando-se os achados de resistência da cefalotina (100%) em amostras de 12/12 pacientes, ceftazidima (96%) em 24/25 pacientes, e ceftriaxona (88,2%) em 30/34 pacientes analisados. Em 41 casos testados para amicacina e 10 para gentamicina, aminoglicosídeos administrados aos pacientes, exibiram resistência bacteriana em aproximadamente 61% dos casos.

Tabela 7 - Antimicrobianos utilizados em terapia empírica em pacientes internados, a partir das 487 coletas de amostras microbianas e avaliação da resistência dos microrganismos isolados nesses pacientes, frente aos antimicrobianos administrados.

Antimicrobianos administrados aos pct e testados frente às bactérias	Pcts em uso do antimicrobiano (%)	Bactérias isoladas e avaliadas frente ao antimicrobiano	Resistência (%) ao antimicrobiano testado
Amicacina	131(26,9)	41	25(61,0)
Ceftazidima	103(21,1)	25	24(96,0)
Oxacilina	99(20,3)	7	4(57,1)
Clindamicina	97(19,9)	4	3(75,0)
Ceftriaxona	93(19,1)	34	30(88,2)
Cefepime	59(12,1)	21	16(76,2)
Cefalotina	39(8,0)	12	12(100,0)
Metronidazol	39(8,0)	-	-
Ciprofloxacina	36(7,4)	25	18(72,0)
Vancomicina	27(5,5)	3	0
Gentamicina	17(3,5)	10	6(60,0)
Imipenem	15(3,1)	7	3(42,9)
Outros	16(3,3)	-	-

Obs: muitos pacientes estavam em uso de mais de um desses antimicrobianos no momento da coleta (associação de antimicrobianos).

Pct – paciente.

Fonte: (Autor, 2011).

5.4 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos

Na **Tabela 8**, estão listados os antimicrobianos avaliados quanto à atividade frente as 269 bactérias isoladas na UEA em relação às características tintoriais da sua parede celular pelo método de Gram. O perfil geral de sensibilidade das bactérias da UEA aos antimicrobianos foi de 34,3%, sendo 35,1% para bactérias Gram negativas e 44,8% para Gram positivas. Houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade das bactérias quando separadas por Gram ($p<0,001$).

De forma geral, as bactérias isoladas na UEA demonstraram sensibilidade mais elevada para fluoroquinolonas (50,3%) e cloranfenicol (65%). Entre os antimicrobianos beta-lactâmicos testados em bactérias Gram positivas, houve destaque para as cefalosporinas de 3^a geração (ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima) apresentando 69,5% de sensibilidade. Entretanto, nas bactérias Gram negativas a sensibilidade foi significativamente mais baixa (14,5%; p<0.001). Dentre os antimicrobianos testados contra bactérias Gram negativas, os carbapenêmicos evidenciaram melhor atividade (90,1%).

Tabela 8 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos em 269 microrganismos classificados pela coloração de Gram.

Antimicrobianos	n	Sensibilidade Geral (%)	Gram Negativos S (%)	Gram Positivos S (%)	P-Valor
β-Lactâmicos					
Penicilinas lábeis	290	20(6.9)	11(6.1)	9(8.2)	0.486
Inibidores de β-Lactamase	321	64(19.9)	42(16.6)	22(32.4)	0.005
Oxacilina	37	5(13.5)	-	5(13.5)	-
Aztreonam	144	16(11.1)	16(11.5)	0	1.000
Cefalosporinas 1 ^a G	129	18(14.0)	6(6.2)	12(37.5)	<0.001
Cefalosporinas 2 ^a G	147	44(29.9)	26(23.4)	18(50.0)	0.003
Cefalosporinas 3 ^a G	625	206(33.0)	60(14.5)	146(69.5)	<0.001
Cefalosporinas 4 ^a G	206	80(38.8)	69(39.4)	11(35.5)	0.841
Carbapenêmicos	425	351(82.6)	329(90.1)	22(36.7)	<0.001
Não β-Lactâmicos					
Aminoglicosídeos	451	151(33.5)	132(32.7)	19(40.4)	0.327
Tetraciclina	44	11(25.0)	7(20.0)	4(44.4)	0.195
Fluoroquinolonas	314	158(50.3)	140(52.2)	18(39.1)	0.112
Sulfametoxazol+ Trimetoprim	49	12(24.5)	7(21.2)	5(31.3)	0.492
Cloranfenicol	123	80(65.0)	52(58.4)	28(82.4)	0.019
Vancomicina	38	38(100)	-	38(100)	-
Clindamicina	29	10(34.5)	-	10(34.5)	-
Eritromicina	38	10(26.3)	-	10(26.3)	-
Ácido nalidíxico	16	4(25.0)	4(25.0)	-	-
Nitrofurantoína	29	17(58.6)	13(52.0)	4(100)	0.121
Perfil Geral	3455	1184(34.3)	914(35.1)	381(44.8)	<0.001

S – Sensível. Valor de p determinado por teste de χ^2 e exato de Fisher.

Penicilinas Lábeis (amoxacilina, ampicilina, penicilina); Inibidores de beta-lactamase (amoxacilina+clavulonato, piperacilina+tazobactam); Cefalosporinas 1^a Geração (cefalotina); Cefalosporina 2^a Geração (cefoxitina); Cefalosporina 3^a Geração (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima); Cefalosporina 4^a Geração (cefepime); Carbapenêmicos (imipenem, meropenem); Aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina); Fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina). Fonte: (Autor, 2011).

Os antimicrobianos não beta-lactâmicos de maior atividade frente aos microrganismos Gram negativos foram as fluoroquinolonas (52,2%), cloranfenicol (58,4) e a nitrofurantoína (52%). A vancomicina, somente administrada à Gram positivos, evidenciou atividade absoluta frente às espécies de *Staphylococcus*. Outro antimicrobiano com importante atividade foi o cloranfenicol com 82,4%.

Os dados de resistência obtidos em nossos estudos (UEA) foram avaliados e comparados com os programas internacionais de vigilância em resistência microbiana: *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* – EARS Net, europeu (ECDC, 2010); *SARI*, alemão (MEYER et al., 2003); *National Healthcare Safety Network* – NHSN, americano (HIDRON et al., 2008); e SENTRY, desenvolvido por indústrias farmacêuticas (DESHPANDE et al., 2006; GALES et al., 2009; JONES et al., 2009), como podem ser observados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Perfil de resistência dos microrganismos da UEA e os programas de vigilância SARI, NHSN, EARS e SENTRY.

Microrganismo	ATB* ¹	UEA	SARI	NHSN	EARS	SENTRY
		n (%R)	n (%R)	n (%R)	n (%R)	n (%R)
<i>Escherichia coli</i>	AMG	34 (29.4)	1447 (1.0)	-	50699 (7.9)	20138 (6.0)
	CARB	28 (3.6)	1584 (0.0)	439 (2.5)	-	20138 (0.0)
	CEF 3G	44 (45.5)	2393 (1.0)	489 (5.3)	49720 (7.4)	40276 (4.9)
	FLU	29 (34.5)	1897 (9.5)	629 (22.7)	48054 (19.7)	20138 (13.4)
<i>Klebsiella-Enterobacter</i>	AMG	143 (61.5)	716 (0.6)	-	11922 (23.4)	14183 (12.1)
	CARB	120 (6.7)	752 (0.1)	153 (5.2)	10573 (7.0)	28366 (0.2)
	CEF 3G	204 (82.8)	1099 (6.3)	199 (13.6)	11665 (27.6)	28366 (18.7)
	FLU	112 (27.7)	830 (7.5)	-	11344 (28.2)	14183 (9.1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMG	99 (70.7)	1027 (7.7)	196 (2.0)	8223 (17.5)	-
	CARB	94 (14.9)	1334 (25.4)	279 (11.8)	8129 (19.0)	25460 (20.3)
	CAZ	49 (98.0)	1494 (15.3)	313 (7.3)	7937 (14.8)	25460 (24.2)
	CPM	47 (21.3)	-	261 (5.7)	-	25460 (22.3)
<i>Staphylococcus CN</i>	OXA	11 (63.6)	-	-	-	812 (78.7)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	OXA	21 (52.4)	2516 (19.3)	2045 (49.2)	30680 (19.4)

n – quantidade de microrganismos testados em cada programa e para cada antimicrobiano.

CN – coagulase negativo

Percentagem de cor vermelha: dados da UEA com resistência estatisticamente maior que o programa de vigilância analisado ($p<0,05$).

Percentagem de cor azul: dados da UEA com resistência estatisticamente menor que o programa de vigilância analisado ($p<0,05$).

Percentagem de cor preta: Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados da UEA e o programa de vigilância analisado ($p>0,05$).

Valor de p determinado por teste de X^2 e exato de Fisher.

*¹ATB – Antimicrobianos: AMG (gentamicina e amicacina), CARB (imipenem e meropenem), CAZ (ceftazidima), CPM (cefepime), CEF 3G (ceftriaxona e ceftazidima e ceftaxima), FLU (ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina) e OXA (oxacilina).

Fonte: (Autor, 2011).

Os microrganismos e antimicrobianos selecionados para o estudo foram aqueles frequentemente pesquisados em programas de vigilância microbiana internacionais, também analisados pela UEA.

Entre os antimicrobianos testados frente a *E. coli*, destaca-se a resistência às cefalosporinas de 3^a geração (CEF 3G) com 45,5% na UEA, maior que todos os outros programas. A resistência aos carbapenêmicos (CARB) foi discretamente mais elevada. Quanto ao grupo *Klebsiella-Enterobacter* elevada resistência foi observada aos antimicrobianos aminoglicosídeos (AMG) e cefalosporinas de 3^a geração (CEF 3G) em 61,5% e 82,8% dos casos, respectivamente, dados maiores que os outros programas.

Os isolados de *P. aeruginosa* exibiram marcante resistência sobre os antimicrobianos ceftazidima (CAZ) com 98% e os aminoglicosídeos (AMG) com 70,7%. Apenas o programa SARI evidenciou resistência maior que a UEA, no caso dos carbapenêmicos (CARB). Os outros resultados de resistência aos antimicrobianos da UEA apresentaram-se discretamente maiores do que os programas de vigilância internacionais.

O perfil de resistência das principais bactérias isoladas na UEA foi comparado aos dados do programa de vigilância em resistência microbiana brasileiro, Rede de Resistência Microbiana (RM) da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009) e podem ser observados na **Tabela 10**.

A avaliação refere-se ao período de janeiro a julho de 2008 e foi dividida em dados nacionais (RM BR), do estado de São Paulo (RM SP) por possuir o maior número de hospitais participantes (n=24), e do estado de Pernambuco (RM PE), estado vizinho a Alagoas.

Quanto aos dados da Rede RM Nacional (RM BR), Paulista (RM SP) e Pernambucano (RM PE), não houve diferença significativa entre os resultados de resistência para os 03 grupos de antimicrobianos (CARB, CEF 3G e FLU) testados para *E. coli*, e a oxacilina (OXA) para as espécies de *Staphylococcus* quando comparados à UEA.

Os dados da Rede RM para *P. aeruginosa* e o grupo *Klebsiella-Enterobacter* exibiram elevada resistência às cefalosporinas de 3^a geração (CEF 3 G), ceftazidima (CAZ) e aminoglicosídeos (AMG). Os isolados de *P. aeruginosa* na UEA foram mais sensíveis aos carbapenêmicos (CARB) e ao cefepime (CPM) do que os dados da Rede RM em geral.

Tabela 10 - Perfil de resistência dos microrganismos em relação aos dados da UEA e o programa de vigilância brasileiro - Rede de Resistência Microbiana. Dados nacionais (RM BR), estado de São Paulo (RM SP) e estado de Pernambuco (RM PE).

Microrganismo	ATB* ¹	UEA	RM BR	RM SP	RM PE
		n (%R)	n (%R)	n (%R)	n (%R)
<i>Escherichia coli</i>	CARB	28 (3.6)	83 (0.0)	61 (0.0)	3 (0.0)
	CEF 3G	44 (45.5)	110 (40.9)	67 (47.8)	4 (25.0)
	FLU	29 (34.5)	49 (28.6)	33 (39.4)	-
<i>Klebsiella-Enterobacter</i>	CARB	120 (6.7)	524 (1.7)	171 (1.8)	86 (4.7)
	CEF 3G	204 (82.8)	654 (55.5)	199 (57.3)	119 (56.3)
	FLU	112 (27.7)	296 (32.4)	96 (42.7)	45 (28.9)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMG	99 (70.7)	298 (35.9)	90 (46.7)	50 (38.0)
	CARB	94 (14.9)	300 (34.3)	89 (39.3)	51 (27.5)
	CAZ	49 (98.0)	153 (37.3)	46 (47.8)	19 (36.8)
	CPM	47 (21.3)	156 (38.5)	44 (52.3)	28 (25.0)
<i>Staphylococcus CN</i>	FLU	55 (41.8)	200 (35.5)	60 (45.0)	29 (37.9)
	OXA	11 (63.6)	449 (78.8)	130 (83.8)	84 (72.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	OXA	21 (52.4)	258 (59.7)	94 (61.7)	50 (60.0)

n – quantidade de microrganismos testados em cada programa e para cada antimicrobiano.

CN – coagulase negativo

Percentagem com fonte de cor vermelha: dados da UEA com resistência estatisticamente maior que o programa de vigilância analisado ($p<0,05$).

Percentagem de cor azul: dados da UEA com resistência estatisticamente menor que o programa de vigilância analisado ($p<0,05$).

Percentagem cor preta: Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados da UEA e o programa de vigilância analisado ($p>0,05$).

Valor de p determinado por teste de X^2 e exato de Fisher.

*¹ATB – Antimicrobianos: AMG (gentamicina e amicacina), CARB (imipenem e meropenem), CAZ (ceftazidima), CPM (cefepime), CEF 3G (ceftriaxona e ceftazidima e ceftaxima), FLU (ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina) e OXA (oxacilina).

Fonte: (Autor, 2011).

5.5 Detecção de Mecanismos de Resistência

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos avaliados durante o período de estudo para as enterobactérias foram o teste de resistência induzível para AmpC e o teste de aproximação de disco para ESBL. Para espécies de *Pseudomonas* foi realizado o teste para detecção de AmpC (**Figura 7**).

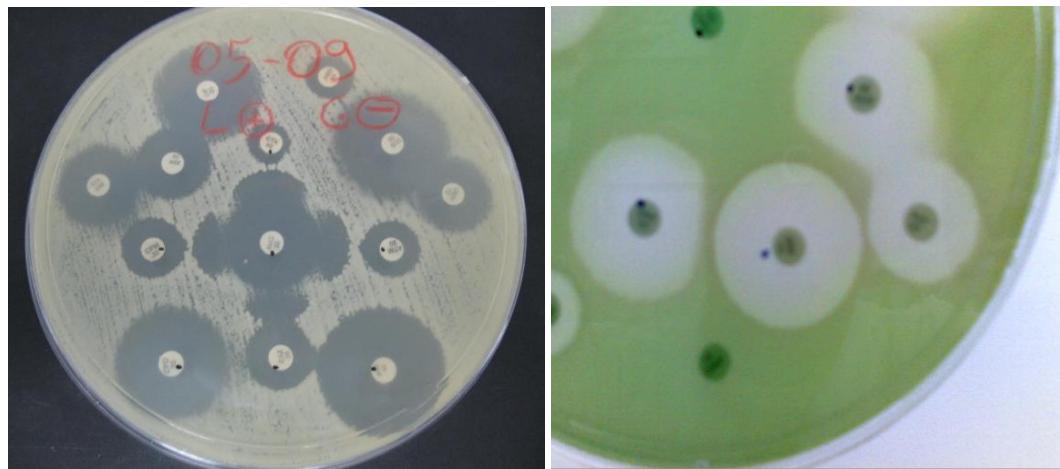


Figura 7 - Testes para detecção de perfis de resistência. À esquerda, surgimento da zona fantasma por ESBL; à direita, inibição de uma lateral do halo por indução de resistência (D-teste) para AmpC.

Fonte: (Autor, 2011).

A **Tabela 10** revela os mecanismos de resistência identificados no laboratório LABMEG. Foram observados 77 isolados de enterobactérias, 52 isolados de *Pseudomonas* e 32 de *Staphylococcus*, entre *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativos.

Tabela 11 - Mecanismos de resistência detectados nas amostras provenientes da UEA.

Microrganismo	Total	Mecanismo de Resistência	n	(%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	77	Produção de β -Lactamase	55	(71.4)
		ESBL	43	(55.8)
		AmpC	12	(15.6)
<i>Pseudomonas</i> sp.	52	AmpC	33	(63.5)
<i>Staphylococcus</i> sp.	32	Resistência à Meticilina	18	(56.3)
<i>S. aureus</i>	21	MRSA	11	(52.4)
<i>Staphylococcus</i> CN	11	MRS	7	(63.6)
<i>Staphylococcus</i> sp.	28	Resistência ao grupo MLS	17	(60,7)
		MLS induzível	0	(0)
		MLS constitutiva	17	(60,7)

ESBL – beta-lactamase de espectro estendido. MRSA – *S. aureus* resistentes à meticilina.

MRS – *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina.

CN – coagulase negativo. MLS – macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B.

Fonte: (Autor, 2011).

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* exibiram algum tipo de produção de beta-lactamase em 71,4% dos casos, sendo a ESBL a mais comum (55,8%). Espécies de *Pseudomonas* também exibiram elevada produção de beta-lactamase, mas do tipo AmpC (63,5%). Quanto aos estafilococos, a detecção de resistência à meticilina foi evidenciada em 56,3% dos isolados. Nenhum dos isolados de estafilococos foi detectado com a resistência para MLS induzível, sendo considerada a forma constitutiva em 17 (60,7%) casos.

5.6 Análise Molecular

5.6.1 PCR de Amplo Espectro, Sequenciamento e Alinhamento por BLASTn

Duzentos e dois microrganismos isolados de pacientes internados na UEA tiveram seu DNA extraído e posteriormente amplificados com iniciadores universais para bactérias, específicos para a região do gene rRNA 16S. Os amplicons obtidos foram de aproximadamente 500 pares de bases, correspondentes a amplificação parcial do gene rRNA 16S (**Figura 8**).

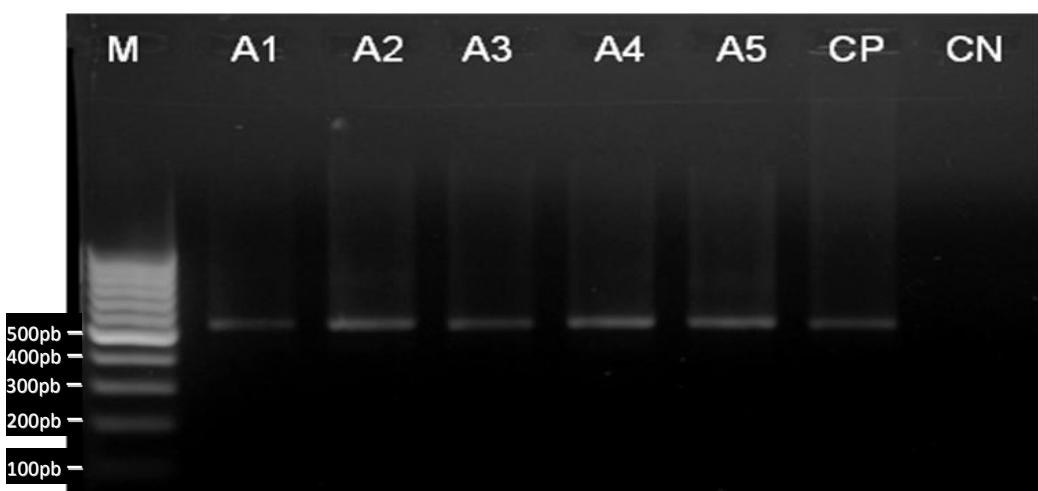


Figura 8 - Resultado de eletroforese em gel de agarose a 2% e amplicon de aproximadamente 500pb da amplificação parcial do gene rRNA 16S (M - Marcador 100pb, A1 a A5 – Amostras, CP – Controle Positivo e CN – Controle Negativo).
Fonte: (Autor, 2011).

Em seguida foram submetidos à reação de sequenciamento, produzindo eletroferogramas (**Apêndice C**). O tamanho médio das sequências obtidas pela análise do sequenciador foi de 446 ± 54 nucleotídeos.

As sequências foram submetidas ao alinhamento nos bancos genéticos GenBank e RDP II, através da ferramenta BLASTn, e os *hits* de maior *score* selecionados permitiram a atribuição de identificação taxonômica aos microrganismos (**Apêndice D e E**).

Avaliando-se as 202 sequências bacterianas frente aos bancos genéticos, foi possível observar que a identificação em espécie no GenBank foi determinada em 88,1% dos casos, 7,9% somente até gênero, 3,5% em família e 0,5% em classe. No RDP, as espécies foram

identificadas em 88,6% dos casos, 6,4% para gênero, 4% em família e 1% em classe (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Avaliação das 202 sequências bacterianas frente aos bancos genéticos GenBank (NCBI) e RDP (Ribosomal Database Project II) quanto à semelhança e atribuição de identificação.

	GenBank(%)	RDP(%)	Taxa de Concordância(%)
Espécie	178(88.1%)	179(88.6%)	171(84.7%)
Gênero	16(7.9%)	13(6.4%)	189(93.7%)
Família	7(3.5%)	8(4.0%)	200(99.1%)
Classe	1(0.5%)	2(1.0%)	-

Fonte: (Autor, 2011).

Do total de sequências de microrganismos analisadas que foi possível atribuir identificação, houve concordância entre os resultados dos bancos em 171 (84,7%) casos para espécie, 189 gêneros (93,7%) e 200 para família (99,1%).

Os isolados bacterianos identificados em nosso estudo através do diagnóstico molecular são apresentados na **Tabela 13**. Quanto às famílias avaliadas, destacam-se a *Enterobacteriaceae* com 74 isolados (36,6%), 48 (23,8%) *Pseudomonadaceae*, 39 (19,3%) isolados de *Moraxellaceae* e 27 (13,4%) *Staphylococcaceae*.

Entre os gêneros mais frequentes estão 48 (23,8%) *Pseudomonas*, 39 (19,3%) isolados de *Acinetobacter*, *Klebsiella* com 34 (16,8%) isolados, 27 (13,4%) *Staphylococcus* e 13 (6,4%) *Enterobacter*.

A espécie mais frequentemente identificada foi *P. aeruginosa*, determinada inequivocamente em 46 casos. O microrganismo *A. baumannii* foi a segunda espécie de maior frequência com 38 isolados identificados, seguidos de 24 *K. pneumoniae* e 17 *S. aureus*.

Quanto aos microrganismos que não atingiram identificação em espécie, estes representaram 10% do total avaliado. São pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo 10 (5%) casos de *Klebsiella*, 8 (4%) *Enterobacter* e 1 (0,5%) *Staphylococcus*.

Em apenas 2 (1%) isolados, não foi possível a determinação taxonômica, nem mesmo em família, pois os bancos genéticos não exibiram concordância entre seus resultados. As duas sequências de microrganismos evidenciaram o mesmo Score para *Serratia marcescens* (*Enterobacteriaceae*) e *Pseudomonas fluorescens* (*Pseudomonadaceae*).

Tabela 13 - Isolados bacterianos identificados através de diagnóstico molecular por BLASTn em bancos genéticos. Em alguns casos não foi possível a determinação em espécie ou gênero.

Família	n	%	Gênero	n	%	Espécie	n	%
<i>Bacillaceae</i>	1	0.5	<i>Bacillus</i>	1	0.5	<i>B. clausii</i>	1	0.5
<i>Corynebacteriaceae</i>	4	2.0	<i>Corynebacterium</i>	4	2.0	<i>C. amycolatum</i>	1	0.5
						<i>C. striatum</i>	3	1.5
<i>Enterobacteriaceae</i>	74	36.6	<i>Escherichia</i>	5	2.5	<i>E. coli</i>	5	2.5
			<i>Enterobacter</i>	13	6.4	<i>E. cloacae</i>	1	0.5
						<i>E. hormaechei</i>	5	2.5
						<i>Enterobacter sp.</i>	8	4.0
			<i>Klebsiella</i>	34	16.8	<i>K. pneumoniae</i>	24	11.9
						<i>Klebsiella sp.</i>	10	5.0
			<i>Morganella</i>	3	1.5	<i>M. morganii subsp. morganii</i>	3	1.5
			<i>Proteus</i>	4	2.0	<i>P. mirabilis</i>	4	2.0
			<i>Providencia</i>	2	1.0	<i>P. stuartii</i>	2	1.0
			<i>Serratia</i>	2	1.0	<i>S. marcescens</i>	2	1.0
			<i>Não identificados</i>	11	5.4			
<i>Enterococcaceae</i>	5	2.5	<i>Enterococcus</i>	5	2.5	<i>E. faecalis</i>	4	2.0
						<i>E. gallinarum</i>	1	0.5
<i>Moraxellaceae</i>	39	19.3	<i>Acinetobacter</i>	39	19.3	<i>A. baumannii</i>	38	18.8
						<i>A. radioresistens</i>	1	0.5
<i>Paenibacillaceae</i>	1	0.5	<i>Brevibacillus</i>	1	0.5	<i>B. agri</i>	1	0.5
<i>Pseudomonadaceae</i>	48	23.8	<i>Pseudomonas</i>	48	23.8	<i>P. aeruginosa</i>	46	22.8
						<i>P. cedrina subsp. fulgida</i>	1	0.5
						<i>P. putida</i>	1	0.5
<i>Staphylococcaceae</i>	27	13.4	<i>Staphylococcus</i>	27	13.4	<i>S. aureus</i>	17	8.4
						<i>S. epidermidis</i>	3	1.5
						<i>S. haemolyticus</i>	2	1.0
						<i>S. hominis</i>	2	1.0
						<i>S. saprophyticus</i>	1	0.5
						<i>S. sciuri subsp. sciuri</i>	1	0.5
						<i>Staphylococcus sp.</i>	1	0.5
<i>Xanthomonadaceae</i>	1	0.5	<i>Stenotrophomonas</i>	1	0.5	<i>S. maltophilia</i>	1	0.5
<i>Não identificados</i>	2	1.0						
<i>Identificados</i>	200	99.1		189	93.7		171	84,7

Fonte: (Autor, 2011).

5.6.2 Alinhamento Múltiplo por CLUSTALW

Entre os microrganismos que foram identificados apenas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as espécies *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* e *Enterobacter hormaechei* foram os mais frequentes dentre os resultados do BLASTn, exibindo score semelhante, sendo

então escolhidos para avaliação por alinhamento múltiplo. Recentemente, *E. sakazakii* foi reclassificado como *Citrobacter sakazakii*, através de fingerprint, ribotipagem e análise do gene rRNA 16S (IVERSEN et al., 2007; IVERSEN et al., 2008). Entre aqueles identificados como pertencentes ao gênero *Klebsiella*, foram selecionadas as sequências de *K. pneumoniae*, *K. granulomatis*, *K. variicola* e *K. oxytoca*.

Com o intuito de considerar a microheterogeneidade das espécies, foram selecionadas sequências de referência do GenBank para a criação de sequências consenso para cada espécie (**Apêndice B**).

O alinhamento múltiplo entre as sequências através do CLUSTALW permitiu a criação de sequências consenso para cada espécie, e as semelhanças/diferenças entre essas espécies foram destacadas (**Apêndice F e G**).

A distribuição de nucleotídeos no alinhamento múltiplo de sequências consenso tornou possível a observação de padrões que permitiram a distinção de boa parte dos microrganismos. Considerando como referência para o alinhamento o primeiro nucleotídeo da sequência consenso de *E. coli* como a posição 1, os esquemas de identificação para a distinção entre as espécies foram criados, como mostrado no **Quadro 1**. Para a distinção de espécies de *Klebsiella* foi utilizada como referência para o posicionamento do alinhamento, a sequência *K. pneumoniae* consenso.

Das 11 amostras identificadas apenas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* por BLASTn nos bancos genéticos, foi possível determinar por alinhamento múltiplo: 03 isolados de *E. coli*, 02 isolados *E. cancerogenus*, 02 identificados apenas como pertencentes ao gênero *Enterobacter*, 02 isolados pertencentes ao Grupo *E. coli / Shigella* (não sendo possível a distinção) e em 02 casos, não foi possível determinar em espécie, nem gênero (**Tabela 14 e Apêndice I**).

O gênero *Enterobacter* foi atribuído a 08 sequências pelo BLASTn. A análise dos nucleotídeos por alinhamento múltiplo no CLUSTALW confirmou pertencerem a esse gênero. Entretanto, não permitiu a distinção entre as espécies, pois exibiram elevado grau de similaridade, mesmo utilizando o esquema de identificação por posicionamento de nucleotídeos, referido no **Quadro 1**.

Distinção entre o gênero <i>Enterobacter</i> e o Grupo <i>E. coli / Shigella</i>																		
	66	72	226	250	253	273	455	456	457	458	459	461	469	471	475	476	477	
<i>Enterobacter</i>	A/G	A/G	A/G	A	A	T	C	G	A	C/T	A/G	G	A	C	T	C	G	
<i>E. coli / Shigella</i>	A	A	G	A/T	A/T	A/T	G	A	G	T	A	A	C	T	C	T	C	
Distinção entre <i>E. coli</i> e espécies do gênero <i>Shigella</i>																		
	76	79	89	90	93	183	208	250	253	273								
<i>Escherichia coli</i>	G	A/G	G/T	C/T	C/T	C	C/T	A/T	A/T	A/T								
<i>Shigella dysenteriae</i>	A/G	G	G	C	C/T	C	T	A/T	A/T	A/T								
<i>Shigella flexneri</i>	G	G	G	C/T	C	C	T	A/T	A/T	A/T								
<i>Shigella sonnei</i>	G	A	G	T	C	C	T	A	A	T								
<i>Shigella boydii</i>	G	A/T	G	A/T	C	T	T	T	T	A								
Distinção entre espécies do gênero <i>Enterobacter</i>																		
	19	66	72	75	76	92	93	226	458	459	473							
<i>E. cancerogenus</i>	A/C	A/G	A/G	G/C	A/G	C/T	C/G	A/G	T	A/G	T							
<i>E. hormaechei</i>	C	A	A	G	G	T	C	G	C/T	A	T							
<i>E. cloacae</i>	A	A	A	G	G	T	C/T	G	C/T	A	T							
<i>E. sakazakii</i>	C	A	A	G	G	T	C/T	A/G	T	A/G	C/T							
Distinção entre espécies do gênero <i>Klebsiella</i>																		
	66	216	248	262	454	455	457	471	472									
<i>K. pneumoniae</i>	G	A	A	C	G	G/T	A/G	C/T	A/G									
<i>K. granulomatis</i>	G	A	A	C/T	G	A	A	T	G									
<i>K. variicola</i>	G	A	G	C	G	A/T	G	C	A									
<i>K. oxytoca</i>	A	T	A	C	A/G	A/G	A	T	G									

Quadro 1 - Esquema de identificação de microrganismos através de alinhamento múltiplo e posicionamento de nucleotídeos para cada espécie ou grupo. Para orientar o posicionamento teve-se como base a sequência de *E. coli* consenso. Para o posicionamento de espécies de *Klebsiella* foi utilizada a sequência *K. pneumoniae* consenso. Código de nucleotídeos no Apêndice H.

Fonte: (Autor, 2011).

Tabela 14 - Avaliação de microrganismos não-determinados pelo *score* do BLASTn e nova identificação através do esquema de identificação por alinhamento múltiplo/posicionamento de nucleotídeos para cada espécie.

<i>Enterobacteriaceae</i> (11)	<i>Enterobacter</i> (8)	<i>Klebsiella</i> (10)	<i>P. fluorescens / S. marcescens</i> (2)
n	Nova ID	n	Nova ID
3	<i>E. coli</i>	8	Nenhuma definição
2	<i>E. cancerogenus</i>	2	<i>K. granulomatis</i>
2	<i>Enterobacter</i>	1	Nenhuma definição
2	<i>E. coli / Shigella</i>		
2	Nenhuma definição		

Nova ID – nova identificação

Fonte: (Autor, 2011).

Quanto aos 10 isolados de *Klebsiella* definidos apenas em gênero, foram analisados pelo esquema de identificação, resultando na determinação de 07 espécies de *K. pneumoniae*, 02 *K. granulomatis* e 01 isolado sem definição. Dos isolados de *K. granulomatis*, a diferença para identificação foi observada somente em dois nucleotídeos, timina na posição 262 e guanina na posição 454, permitindo assim distingui-los das outras espécies (**Apêndice J**).

Em dois casos, os resultados do BLASTn não evidenciaram diferença entre duas espécies fenotipicamente diferentes, a *Serratia marcescens* e a *Pseudomonas fluorescens*. Analisando-se por alinhamento múltiplo as duas amostras, observou-se que eram idênticas entre si, indicando ser a mesma espécie. Comparando-as com as sequências consenso de *S. marcescens* e *P. fluorescens*, exibiram diferença de até três nucleotídeos para o primeiro, e 60 nucleotídeos para o segundo. Pôde-se concluir então que os dois isolados tratam-se de *S. marcescens* e as sequências que exibiam elevada similaridade no GenBank, na verdade foram depositadas erroneamente.

No **Apêndice K**, está a relação de microrganismos identificados, o número de acesso das sequências depositadas no GenBank e o código de armazenamento em bacterioteca.

6 DISCUSSÃO

6.1 Internação de Pacientes e Microrganismos Associados às Infecções

A partir da análise dos prontuários, foi possível caracterizar os 271 pacientes internados na UEA, como mostrados na **Tabela 2**. A predominância de pacientes do sexo masculino, na faixa etária de 18 a 54 anos, está relacionada aos principais motivos de internação na UEA: os acidentes automobilísticos e a violência urbana.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2009) por levantamento realizado em 2004, os acidentes automobilísticos têm acometido pessoas na faixa de 5 a 44 anos de idade, preferencialmente adultos jovens, grupo em idade economicamente produtiva. É também considerada a principal causa de morte em todo o mundo entre pessoas de 15 a 29 anos.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2010b), os acidentes automobilísticos e violências, conhecidos como causas externas, representaram 12% do total de mortes ocorridas em 2008. Os homens continuam maioria entre os mortos em 83,1% dos casos. No ano de 2009, em relação às internações em hospitais do SUS, cerca de 8% foram representadas pelas causas externas, ocupando o quinto lugar entre as causas de internação (excluído o grupo gravidez, parto e puerpério). Isto significa que, para cada morte aproximadamente sete pessoas são hospitalizadas no SUS (desconsiderando as reinternações de ocorrências já registradas).

Segundo Braga Júnior et al. (2005), o perfil sócio-demográfico de pacientes vítimas de traumas atendidos em um hospital de referência da rede pública de Fortaleza – CE, também observaram maior predominância do sexo masculino e faixa etária entre 15 a 30 anos. Eles sugeriram que indivíduos do sexo masculino tendem a apresentar um comportamento de risco de maior potencial para causar acidentes.

Segundo dados de 2008 do Instituto Sangari e o Ministério da Justiça, no estudo “Mapa da Violência 2011: Os Jovens do Brasil”, quanto à taxa de óbitos por acidentes de transporte na população jovem, o Estado de Alagoas ocupa a 15^a posição e Arapiraca destaca-se no 8º lugar entre todos os municípios brasileiros com 10 mil habitantes ou mais (WAISELFISZ, 2011). Em Arapiraca, o meio de transporte mais utilizado pela população é a motocicleta, e os

seus acidentes geralmente são graves, levando o indivíduo a óbito ou requerendo atendimento de emergência e internação hospitalar.

Em relação à taxa de homicídios na população jovem, o Estado de Alagoas ocupa o 1º lugar, sendo considerado o mais violento do país, e Maceió é a mais violenta entre as capitais. Arapiraca, apesar de ser o município mais desenvolvido após a capital, ocupa a 27ª posição entre todos os municípios brasileiros com 10 mil habitantes ou mais (WAISELFISZ, 2011).

Na UEA, mesmo com a predominância de pacientes internados do sexo masculino, da faixa etária e diversos motivos de internação, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à presença de patógenos (resultado das culturas microbiológicas) e essas características dos pacientes.

Apesar de vários estudos evidenciarem a maior possibilidade dos pacientes adquirirem infecções nas UTIs do que nas Enfermarias, os achados da UEA, no entanto demonstram o contrário (**Tabela 2 e 3**). Normalmente, os pacientes internados em UTIs encontram-se mais vulneráveis a infecções, inclusive pela severidade da sua doença, além da utilização de procedimentos invasivos, cirurgias complexas e drogas imunossupressoras, que favorecem a penetração dos microrganismos no hospedeiro (KOLLEF e FRASER, 2001; COUTO, PEDROSA e NOGUEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

O próprio perfil da UTI corrobora com a possibilidade de aquisição de infecções, visto que se trata de um ambiente onde ocorre pressão seletiva pelo uso frequente de antimicrobianos de largo espectro. Isto resulta na presença de microrganismos multirresistentes. Por ser uma unidade restrita / fechada, com alta frequência de contato profissional-paciente, o risco de infecção cruzada aumenta através das mãos da equipe profissional mal qualificada. O confinamento do paciente neste tipo de ambiente termina por favorecer a aquisição de infecção (KOLLEF e NIEDERMAN, 2001; KOLLEF e FRASER, 2001; COUTO, PEDROSA e NOGUEIRA, 2003; MOURA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Entretanto, nos hospitais públicos brasileiros que atendem a casos de traumas e que têm poucos recursos disponíveis, a realidade costuma ser diferente. Pacientes internados nas Enfermarias também sofrem infecções frequentes e importantes, seja pela presença de microrganismos multirresistentes, colonizando aqueles pacientes provenientes da UTI, ou pela dificuldade na execução adequada dos cuidados de enfermagem. Este último é complicado pela superlotação hospitalar, insuficiência de profissionais e frequente falta de materiais que

termina por comprometer a qualidade do serviço. Este quadro é normalmente diferente das UTIs, pois sempre é dado prioridade aos seus serviços.

Os pacientes dos quais foram isolados patógenos (culturas positivas), independentemente do seu setor de internação, permaneceram aproximadamente 10 dias a mais internados do que aqueles com culturas negativas ($p<0,001$). Este achado é consistente com outros estudos que ressaltam a influência das infecções na maior permanência do paciente no leito hospitalar (PAPIA et al., 1999; KOLLEF e FRASER, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; BECERRA et al., 2010; KERWAT, GRAF e WULF, 2010).

A utilização de procedimentos invasivos está normalmente associada a uma maior possibilidade de aquisição de infecção (PORIES et al., 1991; LAZARUS et al., 2005). Entretanto, em nossos estudos não foi observada uma diferença significativa entre os pacientes que fizeram uso destes procedimentos e aqueles que não o fizeram. Entre as hipóteses que poderiam justificar este fato, além da doença de base do indivíduo que por si só já é um fator importante, está a pequena quantidade de pacientes que não faziam uso de procedimento invasivo, representando apenas 7% do total, não sendo suficiente para ser significante.

Apesar das amostras de urina terem sido as mais frequentes, o isolamento de patógenos em cultura foi baixo quando comparados as outras amostras (**Tabela 3**). Há pelo menos duas hipóteses que poderiam justificar esse achado, como a utilização frequente de antimicrobianos que apresentam excreção renal; e a própria limitação do método de busca ativa, na seleção de pacientes em uso de SVD acima de 5 dias, em bolsas coletoras com aspecto concentrado ou presença de depósito, que sugerem, nem sempre corretamente, o crescimento microbiano (NETO et al., 2008).

As amostras de exsudatos purulentos de feridas e aspirado traqueal foram aquelas que exibiram maior isolamento de patógenos em cultura. Os estudos de Jamulirat, Narong e Thongpiyapoom (2002) avaliando o perfil de um hospital de traumas, também observaram maior frequência das infecções de feridas cirúrgicas (31,1%) e infecções respiratórias (31,6%) nos pacientes internados.

A maioria das lesões é colonizada por microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, advindos predominantemente de superfícies mucosas, tais como cavidade nasal, oral e intestinal (BOWLER, DUERDEN e ARMSTRONG, 2001; VON EIFF et al., 2001). Segundo Menezes et al. (2007), a diferença na variedade de microrganismos causadores de infecção

entre os hospitais está relacionada com o tipo de serviço prestado por aquela unidade hospitalar, às mudanças nas práticas médicas e o uso de antimicrobianos.

Em relação às infecções do trato urinário (ITU), de acordo com Maki e Tambyah (2001), os pacientes que fazem uso de cateterismo vesical desenvolvem bacteriúria ou candidúria em 25% dos casos a partir do 7º dia de uso de cateter. Quanto maior o tempo de uso, maior será a chance de infecção, acrescendo-se a possibilidade em 5% a cada dia de uso (GASTMEIER et al., 2000; MAKI e TAMBYAH, 2001).

Stamm et al. (2006), também demonstraram a relação entre o maior tempo de utilização de sonda vesical de demora e o desenvolvimento de infecção urinária. Observaram a permanência em média de 9 dias a mais naqueles com ITU, corroborando com os dados da UEA, observados na **Tabela 3**.

A associação entre o uso de sonda vesical de demora por mais tempo e o surgimento de infecção urinária pode ser observada através dos resultados das culturas. Aqueles pacientes com culturas positivas para bactérias ou para leveduras refletiram num maior prolongamento no tempo de internação, quando comparados àqueles com culturas negativas ($p<0,01$), conforme a **Figura 6**.

Esses dados revelam a importância das infecções, sobretudo na possível formação de biofilmes, que são microcolônias bacterianas que aderem a um substrato (cateteres, próteses, parede de vasos) produzindo posteriormente, uma matriz de polissacarídeos e proteínas, onde permanecerão envolvidas (STEWART e COSTERTON, 2001).

Quando as bactérias estão presentes na forma de biofilme, os antimicrobianos têm grande dificuldade de acesso ao interior do biofilme; as células de defesa não penetram adequadamente na matriz para realizar a fagocitose das bactérias; a própria proliferação bacteriana torna-se mais lenta, prejudicando a resposta a alguns antimicrobianos; além da comunicação e associação entre espécies diferentes, que confere maior resistência aos antimicrobianos (STEWART e COSTERTON, 2001; RAO et al., 2008; SIMOES, SIMOES e VIEIRA, 2009).

A infecção urinária e a septicemia, originárias do uso de cateter urinário, representam um enorme custo para o sistema de saúde, pois a colonização bacteriana não pode ser efetivamente eliminada até a remoção do cateter (SAINT e LIPSKY, 1999; GOTELLI et al., 2008). Os cateteres mantêm uma população bacteriana permanente extremamente difícil de ser eliminada.

Quanto aos microrganismos causadores de infecção do trato urinário, aqueles de maior frequência em nosso estudo pertencem à família *Enterobacteriaceae* (52,2%), com destaque para o gênero *Klebsiella* e *Enterobacter*, e a espécie *E. coli*. Leveduras também foram frequentes (28,3%), conforme a **Tabela 4**. Os estudos de Carvalho e Gontijo Filho (2008) também detectaram os membros da família *Enterobacteriaceae* em 48% das ITU, e os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* como os mais frequentes.

Os bacilos Gram negativos foram os principais agentes causadores de infecções em feridas na UEA. Vários estudos em hospitais de trauma diferem dos dados encontrados na UEA, pois demonstra a presença de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos como os mais predominantes causadores de infecção em feridas, principalmente de sítio cirúrgico. Somente em segundo lugar, aparecem os bacilos Gram negativos (MANGRAM et al., 1999; MAKSIMOVIC et al., 2008; OWENS e STOESSEL, 2008; MARKOVIC-DJENIC et al., 2009).

De acordo com Mangram et al. (1999), os patógenos podem ser provenientes de infecções pré-operatórias em sítios distantes daquele que está se desenvolvendo, particularmente em pacientes com inserção de próteses ou outros implantes.

A associação entre ventilação mecânica e infecção do trato respiratório baixo por bacilos Gram negativos não-fermentadores, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foi observada em nossos estudos, sendo corroborada pela literatura (WEBER et al., 2007; TALHA et al., 2009; GARCIA-LEONI et al., 2010; MAGRET et al., 2010).

Uma meta-análise realizada por Siempos et al. (2010) com o objetivo de explorar os fatores preditivos de mortalidade em pacientes com ventilação mecânica associada à pneumonia, concluíram que os pacientes que sofreram choque hipovolêmico ou sepse, exibiam quatro vezes mais chance de adquirir pneumonia e vir a falecer. A infecção por *A. baumannii* também estava associada a uma maior fatalidade.

Avaliou-se também a distribuição das bactérias entre os setores de internação e sua possível associação, como evidenciado na **Tabela 5**. Os resultados demonstraram que na maioria dos casos, não houve predominância estatisticamente significativa entre esses microrganismos e os setores de internação. Entretanto, exceção houve quanto às espécies do gênero *Pseudomonas* e *Enterobacter* que evidenciaram diferença entre os setores de internação, sendo a primeira na UTI ($p=0,028$) e a segunda na Enfermaria ($p=0,021$). A

predominância desses microrganismos nesses setores de internação não pôde ser justificada pela metodologia utilizada.

Vale ressaltar a importância das espécies de *Pseudomonas* na UTI, patógeno reconhecidamente multirresistente a drogas, pois os pacientes internados nesse setor encontram-se mais vulneráveis a infecções e com maior risco de complicações e óbito do que aqueles internados nas Enfermarias, devido principalmente a gravidade da sua doença de base (KOLLEF e FRASER, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

6.2 Administração Empírica de Antimicrobianos

Durante a coleta das 487 amostras dos pacientes internados, 373 (76,6%) estavam em uso de terapia empírica antimicrobiana (**Tabela 6**). Entretanto, não houve diferença significativa quanto ao isolamento do patógeno (cultura positiva) entre os pacientes que fizeram uso e aqueles que não fizeram uso de antimicrobianos ($p=0,267$). Estes dados sugerem que o uso de antimicrobianos na UEA está inadequado ou os patógenos estão tornando-se resistentes a esses antimicrobianos administrados.

Os antimicrobianos são as mais frequentes drogas administradas a pacientes internados, principalmente em hospitais de trauma, devido à exposição de suas lesões ao ambiente. Segundo Bolufer e Montero (2004), os antimicrobianos são utilizados para fins terapêuticos ou profiláticos em cerca de 40% dos pacientes hospitalizados.

No estudo de Carvalho e Gontijo Filho (2008), os pacientes avaliados também exibiram elevado consumo de antimicrobianos em 80,3% dos casos, sendo as cefalosporinas os antimicrobianos mais administrados em 49,6% dos casos. Estes dados são bastante semelhantes aos achados em nosso estudo (**Tabela 7**). No entanto, seus resultados indicam em segundo lugar, a administração de vancomicina em 37,4% dos pacientes.

Os microrganismos isolados de pacientes que estavam em uso dos antimicrobianos listados na **Tabela 7**, e que foram testados frente a esses antimicrobianos, evidenciaram elevada resistência. Destacaram-se os achados de resistência para cefalotina com 100% (12/12), ceftazidima com 96% de resistência (24/25) e ceftriaxona com 88,2% (30/34). Esses resultados sugerem falha terapêutica aos pacientes administrados. Em 41 casos testados para

amicacina e 10 para gentamicina, aminoglicosídeos que foram administrados aos pacientes, houve resistência bacteriana em aproximadamente 60% dos casos, representando assim resistência considerável aos antimicrobianos utilizados pelos pacientes da UEA.

Em outro estudo, Rodrigues e Bertoldi (2010) com o objetivo de determinar o perfil de utilização dos antimicrobianos em 921 pacientes internados obtiveram 52,4% de prevalência de uso de antimicrobianos. Quanto aos antimicrobianos mais utilizados, as cefalosporinas foram as mais frequentes, sendo administradas em 43,4% dos casos. Os autores afirmam que esta frequência pode ter sido influenciada pelo grande número de tratamentos profiláticos em pacientes cirúrgicos. Esta situação é também bastante provável em nosso estudo.

Segundo Mettler et al. (2007), dos 539 pacientes de um hospital suíço que estavam em uso de terapia empírica, 41,4% fizeram uso de amoxicilina associada ao clavulonato e 16,3% de ciprofloxacina. As cefalosporinas de 3^a geração aparecem a partir da 5^a colocação na lista dos antimicrobianos mais administrados, mas com um perfil de utilização pequeno de 4,3%.

Essa elevada utilização de antimicrobianos nas unidades hospitalares resulta num grave problema que é o favorecimento de resistência. Yates (1999) já estimava que em 50% dos casos, há tratamento equivocado, doses incorretas ou duração errônea das doses. Esses fatores associados propiciam o surgimento de um número cada vez maior de microrganismos resistentes (RODRIGUES e BERTOLDI, 2010).

A distinção entre a utilização de antimicrobianos em terapêutica ou profilática não foi possível, pois os prontuários dos pacientes não apresentavam registro suficiente para a diferenciação, não permitindo assim a análise.

6.3 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos

Conforme pôde ser observado na **Tabela 8**, a sensibilidade dos microrganismos da UEA aos antimicrobianos, em geral foi muito baixa (34,3%). Apenas as fluoroquinolonas e o cloranfenicol destacaram-se como as melhores drogas para tratamento empírico, pois exibiram atividade tanto às bactérias Gram negativas, quanto às Gram positivas. Isto indica que quando o agente causador da infecção não era conhecido, esses antimicrobianos poderiam ser utilizados como opção terapêutica.

Apesar dos carbapenêmicos (82,6%), a nitrofurantoína (58,6%) e a vancomicina (100%) exibirem atividade considerável, quando analisados em relação ao perfil geral de sensibilidade, eles não representam uma alternativa adequada para tratamento empírico de pacientes. O primeiro tem atividade excelente contra Gram negativos (90,1%), porém fraca atividade contra Gram positivos (36,7%). O segundo, testado em patógenos isolados de amostras de infecção urinária, teve um número pequeno de amostras analisadas em bactérias Gram positivas (apenas quatro isolados) para poder ser indicado com segurança como alternativa terapêutica. E o último só pode ser utilizado contra bactérias Gram positivas, pois tem efeito somente contra estas.

Quando o agente infeccioso era conhecido, os carbapenêmicos demonstraram ser a melhor escolha (sensibilidade de 90,1%) no combate às bactérias Gram negativas. Quanto às bactérias Gram positivas, as análises para vancomicina exibiram absoluta efetividade, permanecendo ainda como a melhor droga para tratamento de infecções estafilocócicas. Outro antimicrobiano com excelente atividade contra estes microrganismos é o cloranfenicol (82,4%), importante substituto à utilização da vancomicina.

As cefalosporias de 3^a (ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima) evidenciaram atividade importante frente às bactérias Gram positivas (69,5%). Vale ressaltar a necessidade de saber qual o microrganismo causador da infecção, antes de iniciar o tratamento, visto que se tratando de um estafilococo resistente à meticilina (MRSA ou MRS) esses antimicrobianos e todos os outros beta-lactâmicos serão considerados inapropriados, devido ao mecanismo de resistência relacionado a este microrganismo. De acordo com os dados da **Tabela 11**, a resistência à meticilina foi observada em 56,3% dos estafilococos isolados. Isto indica que, em praticamente metade dos casos de infecção por estafilococos, os antimicrobianos beta-lactâmicos não deveriam ser administrados, pois não surtiriam efeito.

Ao se avaliar os resultados de resistência aos antimicrobianos da UEA, comparando-os aos programas internacionais de vigilância em resistência microbiana SARI, NHSN, EARS e SENTRY, foi possível observar que na maioria dos casos, os microrganismos da UEA exibiram maior resistência frente aos antimicrobianos (**Tabela 9**). Em poucos casos, o perfil de resistência não evidenciou diferença estatística significativa.

O programa alemão SARI apresentou resultados de baixa resistência aos antimicrobianos (MEYER et al., 2003). Praticamente todos os dados de resistência da UEA quando comparados aos do SARI evidenciaram maiores taxas. Única exceção houve no caso

da resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos, o qual o SARI apresentou resistência quase duas vezes maior que a UEA, destacando-se entre os estudos internacionais.

Os dados de resistência do programa americano NHSN (HIDRON et al., 2008) quando comparados aos da UEA, demonstram que não houve diferença significativa na resistência dos bacilos Gram negativos aos carbapenêmicos. A resistência de *E. coli* às fluoroquinolonas e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) da UEA também exibiram semelhanças com o NHSN. No restante dos dados, a UEA apresentou maior resistência aos antimicrobianos.

Segundo dados do ECDC (2010), o programa europeu EARS-NET demonstrou que a resistência aos carbapenêmicos também têm se elevado durante os anos, principalmente para *P. aeruginosa*. Os resultados dos carbapenêmicos e fluoroquinolonas exibiram semelhanças com os dados da UEA. Entretanto, outros antimicrobianos exibiram pelo menos o dobro de resistência. A baixa frequência de MRSA também teve destaque, quando comparada à UEA.

O programa SENTRY, por apresentar uma análise em vários países e diferentes continentes, exibiu um perfil misto de resistência (DESHPANDE et al., 2006; GALES et al., 2009; JONES et al., 2009). A presença dos estafilococos resistentes à meticilina, tanto MRSA quanto MRS foram frequentes no SENTRY, não havendo diferença significativa entre os dados da UEA. A resistência aos carbapenêmicos e cefepime por *P. aeruginosa* mesmo sendo mais elevados, também não exibiram significativa diferença. Entretanto, a resistência na UEA foi marcante em todos os outros dados. Em nossos estudos, somente 01 isolado de *E. coli* apresentou resistência aos carbapenêmicos (3.6%).

Na **Tabela 10** são apresentados os resultados da UEA frente aos dados de resistência do programa brasileiro Rede RM (ANVISA, 2009). Resistência importante foi observada aos aminoglicosídeos a nível nacional (RM BR), assim como para os dados paulista (RM SP) e pernambucano (RM PE). Entretanto, os microrganismos da UEA apresentaram resistência quase duas vezes maior a este antimicrobiano. Esta é uma situação preocupante, visto que o antimicrobiano mais administrado na UEA foi a amicacina, pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos.

Apesar da elevada resistência de *E. coli* às cefalosporinas de 3^a geração e dos estafilococos à oxacilina evidenciadas na Rede RM, os dados da UEA também se destacaram não havendo diferença significativa. A UEA exibiu resultados ainda maiores quando avaliados para o grupo *Klebsiella-Enterobacter* e ceftazidima para *P. aeruginosa*.

A crescente resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos tem se demonstrado um importante problema a nível nacional e local. Na UEA, os dados sobre esta resistência ainda

apresentam-se melhores, sendo praticamente a metade da resistência observada nos dados da Rede RM. Estes dados indicam que os carbapenêmicos permaneceram preservados como antimicrobianos de escolha para infecções complicadas, sendo uma importante alternativa terapêutica na UEA. Vale ressaltar ainda, a baixa resistência de *P. aeruginosa* ao cefepime, como outra boa alternativa.

Carvalho e Gontijo Filho (2008) realizaram estudo semelhante numa UTI para adultos, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sobre o perfil de resistência aos principais antimicrobianos contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus* e grupo *Klebsiella / Enterobacter*. As fluoroquinolonas e cefalosporinas de 3^a geração para *E. coli* e a resistência à meticilina pelos *Staphylococcus* não exibiram diferenças significativas. Entretanto, o grupo *Klebsiella / Enterobacter* (57,6%; p=0,002) e *P. aeruginosa* (71,7%; p<0,001) evidenciaram maior resistência para as cefalosporinas de 3^a geração na UEA do que no trabalho dos autores. A resistência às fluoroquinolonas e aos carbapenêmicos foi superior à UEA com 76,1% e 71,7% (p<0,001), respectivamente, sendo ambos com 46 casos (dados não mostrados).

De forma geral, os microrganismos isolados na UEA exibiram perfil de resistência elevado. Foram maiores que os programas de vigilância internacionais, mas semelhantes aos programas brasileiros (Rede RM). Os piores resultados observados foram em relação às cefalosporinas de 3^a geração e os aminoglicosídeos. Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram excelente sensibilidade aos carbapenêmicos, representando os melhores resultados quando comparados aos programas nacionais e internacionais.

6.4 Detecção de Mecanismos de Resistência

Os mecanismos de resistência ESBL, AmpC, resistência à meticilina e ao grupo MLS foram analisados nas bactérias isoladas, como mostrado na **Tabela 10**. Foi possível detectá-los em 52% a 71% dos casos.

Os estudos de Lago, Fuentefria e Fuentefria (2010), em um hospital paulista, observaram a produção de ESBL em 28,4% das enterobactérias isoladas. Taneja et al. (2008) ao avaliarem uropatógenos, realizaram a pesquisa fenotípica de ESBL e detectaram sua

produção em 36,5% dos casos de infecção urinária por enterobactérias. A produção de ESBL por enterobactérias em nossos estudos foi elevada (55,8%), quando comparados aos estudos supracitados.

Estudos de Kiratisin & Henprasert (2011), demonstraram sensibilidade de 71% e especificidade de 98,6% na detecção fenotípica de ESBL, de acordo com as recomendações do CLSI. A baixa sensibilidade sugere que a detecção fenotípica de ESBL pode estar subestimada, sendo, por consequência, seus valores reais mais elevados.

Em nossa pesquisa, poucas enterobactérias foram detectadas com o fenótipo de resistência AmpC (15,6%). No entanto, *P. aeruginosa* exibiu elevada produção dessa enzima (63,5%).

Segundo estudos de Patel et al. (2010) no Departamento de Urologia de um Hospital Terciário da Índia, dos 328 isolados de amostras de urina, 228 (69,5%) eram produtores de beta-lactamase, sendo 104 (45,6%) diagnosticados como AmpC positivos através do método de disco-difusão.

Alguns estudos tem demonstrado a prevalência de AmpC induzida em *P.aeruginosa* (BHATTACHARJEE et al., 2008; MORTARI et al., 2008; MOHAMUDHA, HARISH e PARIJA, 2010). O surgimento de novos perfis de resistência e a própria limitação das técnicas fenotípicas para detecção de AmpC tem justificado a utilização de metodologia genotípica para uma melhor elucidação dos casos de resistência (DUNNE e HARDIN, 2005).

A resistência à meticilina por *S.aureus* (52,4%) e *Staphylococcus* CN (63,6%) foram importantes na UEA. Entretanto, exibiram taxas menores que os estudos de Markovic-Djenic et al. (2009) que evidenciaram a predominância dos estafilococos como causadores de infecção, enfatizando a necessidade de melhorias nas medidas de isolamento de contato de pacientes em um instituto ortopédico sérvio. Em seu estudo, analisando 277 pacientes, foram isolados 82 microrganismos a partir de amostras de infecção de ferida cirúrgica, destes, 24 (29,2%) eram do gênero *Staphylococcus*, sendo 19 (79,2%) resistentes à meticilina.

Apesar da presença dos estafilococos resistentes à meticilina ser evidente em vários estudos, inclusive demonstrado pelos programas de vigilância internacionais e nacionais, os estudos de Cook, Berne e Norwood (2009), avaliando a incidência de MRSA, num Centro de Trauma, exibiu baixa prevalência de infecção por esses estafilococos (1,4%).

Na **Tabela 8**, apesar de se observar atividade mediana das cefalosporinas de 2^a e 3^a geração frente às bactérias Gram positivas, 50,0% e 69,5% respectivamente, os estafilococos que são os representantes deste grupo, devem ser analisados quanto à resistência à meticilina

(MRSA ou MRS), visto que essa resistência compromete todos os beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, independentemente do resultado do antibiograma para essas drogas. A importância desses dados está no fato destes antimicrobianos serem bastante utilizados como terapia empírica aos pacientes, como pôde ser observado na **Tabela 7**.

A frequência de microrganismos com perfis de resistência como ESBL, AmpC, MRSA, entre outros, dependerá da sensibilidade da técnica para diagnóstico desses mecanismos de resistência; dos antimicrobianos administrados aos pacientes, os quais estes microrganismos sofrem pressão seletiva; e a variedade de microrganismos causadores de infecção naquele ambiente hospitalar, pois a mesma cepa bacteriana pode ser responsável pelos diferentes tipos de infecções.

6.5 Identificação Molecular

A taxa de identificação de microrganismos em espécie, através de sequenciamento e análise no GenBank e RDP, variou entre 88,1% a 88,6% nos bancos genéticos, como verificados na **Tabela 12**. Os resultados das análises nos bancos genéticos evidenciaram alta taxa de concordância entre eles, tornando assim o resultado mais confiável.

Vários estudos têm sido conduzidos comparando a utilidade do sequenciamento do gene rRNA 16S frente aos métodos convencionais ou comerciais para identificação de microrganismos de importância médica. Em geral, os resultados da análise do gene rRNA 16S exibem maior percentagem de identificação em espécie do que os métodos convencionais e comerciais (WOO et al., 2008). O nível de sucesso da identificação tem variado entre 62% a 83%, dependendo do grupo de bactérias em análise e os critérios usados para definição em espécie (BOSSHARD et al., 2003; BOSSHARD et al., 2004; MIGNARD e FLANDROIS, 2006; WOO et al., 2008; RAFI et al., 2010).

Apesar da elevada taxa de identificação, de acordo com Woo et al. (2008), em alguns gêneros existem “pontos-cegos” que o sequenciamento do gene 16S pode não ser suficientemente discriminativo para a identificação de espécies. Mesmo assim, a utilização do sequenciamento na identificação de bactérias de rotina em laboratórios clínicos tem utilidade, principalmente naquelas cepas que são difíceis de serem identificadas pelos testes fenotípicos.

Isto tem levado a um reconhecimento epidemiológico e patogênico mais aprofundado dessas bactérias.

Os isolados bacterianos identificados por sequenciamento e análise do gene rRNA 16S parcial visualizados na **Tabela 13**, demonstram a dificuldade na identificação em gênero/espécie de alguns membros da família *Enterobacteriaceae*.

Segundo Chakravorty et al. (2007), as regiões hipervariáveis de nucleotídeos V1 (69-99), V2 (137-242) e V3 (433-497) que compõem a sequência do rRNA 16S parcial permitem satisfatória distinção entre as espécies de *Staphylococcus* sobretudo na região V1. A região V2 permite definição em gênero da maioria das bactérias relacionadas às análises clínicas, com exceção das espécies de *Escherichia*, *Shigella*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*. A região V3 mostra-se melhor para diferenciar as espécies altamente relacionadas da família *Enterobacteriaceae*, como as espécies do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella*. No entanto, em nossos estudos a identificação em gênero/espécie não foi alcançada em alguns casos.

Com a criação de sequências consenso foi possível observar diferenças entre as sequências das espécies isoladas, como mostradas no **Quadro 1**. Em nosso estudo, a distinção entre as espécies *E. coli* e *S. dysenteriae*, utilizando as sequências consenso foi possível através da observação da localização de 5 nucleotídeos em posições específicas da sequência.

Uma revisão feita por Clarridge (2004), apontando as similaridades entre as sequências de microrganismos, avaliou que alguns deles apresentam genótipos muito similares, mas diferentes fenótipos. No caso do patógeno *E. coli* ATCC 11775 e *S. dysenteriae* ATCC 13313, dois patógenos geneticamente tão próximos que poderiam ser considerados pertencentes à mesma espécie, estão associados à história e clínica bem diferentes. Observou que apenas 3 nucleotídeos permitiam a distinção entre essas espécies nos 500pb sequenciados.

Estudos de Wang, Cao e Cerniglia (1997) já demonstravam a dificuldade na diferenciação entre *E. coli* e espécies de *Shigella*. O sequenciamento do gene 16S rRNA e a análise filogenética mostraram quatro espécies de *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. flexneri*, formando um agrupamento com *E. coli*, evidenciando a sua elevada similaridade. Esta similaridade é que tem resultado em dados inconclusivos do BLASTn nos bancos genéticos.

A maioria dos microrganismos listados nas **Tabelas 13 e 14** são reconhecidamente agentes infecciosos importantes no ambiente hospitalar. Entretanto, alguns são pouco descritos na literatura e/ou raramente isolados em laboratórios clínicos, em parte pela dificuldade na identificação ou por considerá-los uma contaminação amostral.

Em nosso estudo, numa amostra de exsudato purulento de escara na região sacra foram isolados dois microrganismos: *Bacillus clausii* e *P. aeruginosa*. Devido às características da amostra e dos microrganismos, o isolamento de *B. clausii* foi sugestivo de contaminação amostral.

O gênero *Bacillus* comprehende um grande grupo de bacilos Gram positivos aeróbicos e facultativos que se caracterizam pela capacidade de formar esporos em condições aeróbicas (WINN et al., 2008). A espécie *B. clausii* é considerada um agente probiótico, um microrganismo utilizado como alimentação suplementar que afeta beneficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal microbiano (FULLER, 1991).

Vários estudos têm demonstrado sua importância, inclusive na prevenção de infecções respiratória recorrentes em crianças (DUC LE et al., 2004; MARSEGLIA et al., 2007; SINGHI e BARANWAL, 2008).

Outro microrganismo não muito caracterizado em laboratórios clínicos foi isolado na UEA, *Corynebacterium amycolatum* proveniente de um paciente internado com exsudato purulento de escara na região sacra.

O gênero *Corynebacterium* é constituído por bacilos Gram positivos pleomórficos em forma de clava, não formadores de esporos. Muitos dos microrganismos do gênero constituem parte da microbiota normal da pele e das vias respiratórias superiores (VON GRAEVENITZ et al., 1998). Entretanto, essas espécies têm sido reconhecidas como importantes agentes infecciosos, particularmente em hospedeiros imunocomprometidos (FUNKE et al., 1997; LOPEZ et al., 2009; WONG et al., 2010; KIMURA et al., 2011).

A espécie *C. amycolatum*, inicialmente descrita por Collins, Burton e Jones (1988), e assim denominada por carecer dos ácidos corinemicólicos presentes em todas as espécies de *Corynebacterium*, tem sido identificada em infecções humanas significativas (CAMELLO et al., 2003).

Esteban et al. (1999) realizam análise retrospectiva de isolados de *C. xerosis* no período de 1992 a 1997, na Fundação Jiménez Díaz em Madrid – Espanha. Observou que, na verdade se tratavam das espécies *C. striatum* e *C. amycolatum*, relacionadas à infecção por cateter ou feridas cirúrgicas, erroneamente identificadas.

O estudo de Camello et al. (2003) demonstrou a dificuldade na identificação de espécies de *Corynebacterium* não-diftéricos, em pacientes de um hospital universitário do Rio de Janeiro – Brasil. Observou também que *C. amycolatum* pode causar infecção em qualquer sítio infeccioso, pois foi encontrado em todos os tipos de amostras analisadas.

Em um paciente do sexo masculino de 73 anos, com mais de 30 dias de uso de sonda vesical de demora, foi diagnosticado o microrganismo *C. striatum* como causador de ITU em nosso estudo.

C. striatum é encontrado normalmente no gado, como parte da microbiota normal das narinas de seres humanos e na pele humana (WINN et al., 2008). Está relacionado a uma grande variedade de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Entretanto, López et al. (2009) relataram um caso de infecção do trato urinário causada por *C. striatum* numa mulher com cistite e microhematuria (hemácias na urina, sem evidência clínica), sem fatores de risco predisponentes. Foi ressaltada a importância de estudos mais aprofundados em casos de aparente contaminação, pois microrganismos emergentes podem ser os causadores da infecção.

Em nossos estudos, um isolado de *Acinetobacter radioresistens* foi detectado a partir de uma amostra de exsudato purulento de ferida, num paciente com infecção pós-traumática.

A espécie *A. radioresistens* é um cocobacilo Gram negativo não-fermentador que ocorre como habitante natural da pele humana (SEIFERT et al., 1997). Apresenta 4 a 8 vezes mais resistência à radiação *gamma* que os outros componentes do gênero (NISHIMURA et al., 1994; SAHA e CHOPADE, 2009). No entanto, há relatos de bactеремia por *A. radioresistens* em pacientes internados em hospitais americanos detectados pelo projeto SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance* (WISPLINGHOFF et al., 2000).

Outro microrganismo de raro isolamento, a espécie *Brevibacillus agri* foi isolada a partir de uma amostra de aspirado traqueal em paciente internado na Enfermaria do hospital.

B. agri é um bacilo Gram positivo aeróbico e facultativo que se caracteriza por formar esporos em condições aeróbicas. Antigamente pertencente ao gênero *Bacillus*, foi reavaliado a partir da análise de sequência do gene rRNA 16S, sendo então proposto o novo gênero (SHIDA et al., 1996). Os poucos artigos que descrevem *B. agri* relatam sua presença em larvas de abelhas mortas, águas contaminadas e em fábricas de processamento de gelatina (LOGAN et al., 2002). Apenas 01 isolado da Coleção de Cultura ARS (Agricultural Research Service) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, cepa NRRL B-1157 refere o isolamento do microrganismo a partir de uma amostra clínica, em um paciente com febre ondulante (USDA, 2011).

Em nossos estudos, um dos isolados de *Pseudomonas* de um paciente internado exibiu elevada similaridade com a espécie *P. cedrina* subsp. *fulgida*. A amostra foi proveniente de

exsudato purulento de ferida operatório na região occipital, em paciente vítima de perfuração por arma de fogo.

As espécies do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, não-fermentadores da glicose e aeróbios estritos (WINN et al., 2008). Inicialmente estudada por Daboussi et al. (1999), a espécie *Pseudomonas cedrella* foi classificada como pertencente ao grupo I das pseudomônadas, chamado grupo fluorescente. Posteriormente denominada *P. cedrina*, Behrendt et al. (2009) ao estudar a filosfera de gramíneas detectou 4 espécies classificadas como *P. cedrina*, mas que apresentavam características fenotípicas diferentes. Após ribotipagem, com análise do gene rRNA 16S, foi proposto a separação em duas subespécies *P. cedrina subsp. fulgida* e *P. cedrina subsp. cedrina*.

Em nossa pesquisa, uma criança de seis anos de idade, vítima de acidente automobilístico, com exsudato purulento de ferida cirúrgica na coxa direita, foi isolado o microrganismo *Pseudomnas putida* aos 25 dias de tempo de internação.

P. putida é encontrada na água e no solo, inclusive em reservatórios de água no ambiente hospitalar. Pode constituir parte da microbiota normal da faringe, sendo considerada patógeno oportunista em seres humanos. Há relatos de infecções importantes em diversos sítios, como infecção do trato urinário (SAHA, JAIN e KAUR, 2010), bacteremia (YOSHINO et al., 2011), peritonite (DERVISOGLU et al., 2008), artrite séptica (MACFARLANE, OPPENHEIM e LORRIGAN, 1991), infecções em pacientes com câncer (ROLSTON et al., 2005), inclusive com detecção de genes que conferem resistências importantes, como as metallo-beta-lactamases (JUAN et al., 2010; TREVINO et al., 2010).

Na UEA, foi isolado de um paciente internado com 30 anos de idade, o microrganismo *Staphylococcus sciuri*. O paciente, vítima de atropelamento, apresentava exsudato purulento em ferida cirúrgica na perna direita aos 31 dias de internação. Mesmo após administração de antimicrobianos, sofreu amputação do membro.

S. sciuri foi inicialmente descrito por Kloos e colaboradores em 1976, sendo considerada a espécie ancestral e um dos mais abundantes do gênero. Amplamente distribuído na natureza, foi descrito como comensal de espécies de roedores, marsupiais, também sendo isolado em animais domésticos e animais de fazenda (HAUSCHILD e SCHWARZ, 2003).

A importância clínica de *S. sciuri* tem se elevado, pois tem sido associado a infecções como endocardites (WALLET et al., 2000), infecção do trato urinário (STEPANOVIC et al., 2003), infecções de feridas (SHITTU et al., 2004) entre outras. A presença de um homólogo

do gene *mecA* nativo, mostrando similaridade com o *mecA* de *S. aureus*, evidencia a proximidade evolutiva destes determinantes genéticos (WU et al., 1996).

Em alguns casos, a atribuição de identificação aos microrganismos através da análise em bancos genéticos com a ferramenta BLASTn, não foi possível para determinação em gênero/espécie. Os resultados do BLASTn no GenBank forneceram alto *score* de similaridade, não permitindo a diferenciação taxonômica.

Há algumas hipóteses que poderiam justificar a falta de definição na identificação de microrganismos através do BLASTn nos bancos genéticos. Quanto às sequências depositadas nos bancos, há a possibilidade dos microrganismos certificados em coleções, tais como as ATCC, estejam incorretamente denominados ou classificados por metodologia fenotípica (CLARRIDGE, 2004). Outro importante problema está na não-validação das informações encaminhadas aos bancos de dados que aceitam qualquer nomenclatura dada àquela sequência (CLARRIDGE, 2004; ASHELFORD et al., 2005; JANDA e ABBOTT, 2007). Quanto aos microrganismos, há espécies que compartilham sequências 16S similares ou idênticas, tornando a identificação inviável (CLARRIDGE, 2004). O tamanho do fragmento sequenciado é também fator importante, pois alguns gêneros/espécies necessitam ser analisados em diferentes regiões variáveis para serem determinados (CHAKRAVORTY et al., 2007).

6.6 Análise do gene rRNA 16S em Laboratórios de Rotina e seus Custos

A amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S tem permitido uma descrição mais refinada de linhagens de bactérias do que é possível com métodos fenotípicos. Ao longo das últimas décadas, sua utilização foi imprescindível para a reclassificação de bactérias em gênero e espécie, e a descoberta de novos microrganismos. Papel igualmente importante é observado na caracterização de microrganismos raramente isolados, distinção de fenótipos ambíguos, ou bactérias de escassa descrição na literatura.

Atualmente, a utilização do sequenciamento do gene 16S rRNA é ainda mais cara que os métodos tradicionais de identificação para laboratórios de rotina. No entanto, em alguns casos os custos podem ser comparáveis aos métodos tradicionais, particularmente se o

laboratório também realizar o sequenciamento em outras atividades. Segundo Patel (2001), o custo pode ser reduzido pela metade se forem realizadas múltiplas análises ao mesmo tempo.

Na detecção de microrganismos de crescimento lento ou de difícil identificação, os quais requerem baterias de testes adicionais, além da necessidade de mais tempo para incubação e semeio, o sequenciamento pode ser vantajoso, visto que poderá fornecer resultados mais rápidos e acurados. Hall e colaboradores (2003) demonstraram que a identificação de micobactérias atípicas através do sequenciamento é apenas U\$2,00 mais cara que os métodos padrões para identificação, quando o laboratório já dispõe dos equipamentos necessários para o procedimento.

Boudewijns et al. (2006) enfatizaram que a principal dificuldade para a implementação do sequenciamento e análise do gene 16S rRNA está no custo dos equipamentos que ainda permanecem elevados. Outro aspecto também importante está na qualidade das sequências depositadas nos bancos de dados. Como não há validação das sequências encaminhadas aos bancos, muitas sequências apresentam erros, ambiguidades e/ou insuficiente caracterização dos microrganismos (DRANCOURT et al., 2000; BOUDEWIJNS et al., 2006). Os bancos de dados comerciais também apresentam problemas. Estão mais relacionados à baixa diversidade de sequências de microrganismos disponíveis que à propria qualidade dessas sequências (WOO et al., 2003; CLOUD et al., 2004).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ✓ Quanto ao perfil dos pacientes internados na UEA com confirmação ou suspeita de infecção hospitalar prevaleceram aqueles do sexo masculino, entre 18 e 54 anos, vítimas de acidentes automobilísticos e violência urbana.
- ✓ Os pacientes internados na Enfermaria exibiram mais amostras com cultura positiva do que na UTI. O tempo de internação e o tempo de uso de sonda vesical estavam prolongados em pacientes que tiveram cultura positiva;
- ✓ As espécies bacterianas mais frequentemente associadas à infecção hospitalar na UEA foram *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*;
- ✓ A administração empírica de antimicrobianos aos pacientes em estudo da UEA foi elevada, principalmente de cefalosporinas e amicacina;
- ✓ As fluoroquinolonas e o cloranfenicol representaram as melhores drogas para tratamento empírico, isto é, quando o agente causador da infecção não era conhecido. Além desses, no combate a bactérias Gram negativas houve maior destaque para os carbapenêmicos e contra as Gram positivas, a vancomicina foi a mais efetiva.
- ✓ Os programas internacionais de vigilância em resistência microbiana exibiram resultados de menor resistência dos microrganismos aos antimicrobianos do que a UEA. Exceção faz-se aos carbapenêmicos contra isolados de *P. aeruginosa* que, na UEA apresentaram atividade semelhante ou superior.

- ✓ O programa nacional de vigilância em resistência microbiana evidenciou resultados semelhantes ou superiores à UEA, em relação à resistência aos antimicrobianos, principalmente às cefalosporinas e aminoglicosídeos. A UEA apresentou melhores resultados quanto à sensibilidade aos carbapenêmicos e cefepime frente à *P. aeruginosa*;
- ✓ Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos como ESBL, AmpC, resistência à meticilina e ao grupo MLS, foram detectados em mais da metade dos microrganismos analisados, revelando grande preocupação para o tratamento com beta-lactâmicos e o grupo MLS nas infecções bacterianas.
- ✓ A identificação de microrganismos por sequenciamento do gene rRNA 16S e análise em banco genéticos demonstrou elevada taxa de determinação em espécie, inclusive de espécies raramente diagnosticadas por metodologia fenotípica. Portanto, configura-se um importante instrumento para elucidação de casos em que o diagnóstico convencional não permite;
- ✓ Os resultados obtidos por análise no GenBank e no RDP evidenciaram alta taxa de concordância, podendo ser utilizados para atribuição de identificação aos microrganismos;
- ✓ A utilização de sequências consenso permitiu a distinção entre espécies em vários casos que o alinhamento nos bancos genéticos por BLASTn evidenciaram imprecisão. Exceção foi observada entre os isolados do gênero *Enterobacter*, dos quais a identificação foi alcançada em poucos casos;
- ✓ A adequada identificação de um microrganismo através da análise do gene rRNA 16S dependerá também da escolha da região variável que melhor o caracteriza, por meio da utilização de iniciadores específicos que contemplem essa região.

- ✓ A identificação de espécimes bacterianos raros ou emergentes foi possível através da análise do gene rRNA 16S, detectando os microrganismos: *A. radioresistens*, *B. claussi*, *B. agri*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *P. cedrina* subsp. *fulgida*, *P. putida* e *S. sciuri*, que não são rotineiramente identificados em laboratórios clínicos.

- ✓ Os microrganismos analisados foram devidamente armazenados em bacterioteca do laboratório LABMEG da UFAL, Campus Arapiraca, permitindo a recuperação e análise desses microrganismos em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM.** 1. ANVISA 2009.

ANDERSON, K. F. et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2723-5, 2007.

ASHELFORD, K. E. et al. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 7724-36, 2005.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, 2003.

BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCHWEIGHART, S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. **Infection**, v. 17, n. 5, p. 316-21, 1989.

BECERRA, M. R. et al. Epidemiologic surveillance of nosocomial infections in a Pediatric Intensive Care Unit of a developing country. **BMC Pediatr**, v. 10, p. 66, 2010.

BEHRENDT, U. et al. *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* subsp. nov., a fluorescent bacterium isolated from the phyllosphere of grasses; emended description of *Pseudomonas cedrina* and description of *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* subsp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n. Pt 6, p. 1331-5, 2009.

BHATTACHARJEE, A. et al. Prevalence of inducible AmpC beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in northern India. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 1, p. 89-90, 2008.

BOLUFER, J. V. A.; MONTERO, C. T. Estudio de la utilización de antibióticos de un hospital comarcal. Años 1998-2002. **Farm Hosp**, v. 28, n. 6, p. 410-418, 2004.

BOSSHARD, P. P. et al. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative Gram positive cocci in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2065-73, 2004.

BOSSHARD, P. P. et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4134-40, 2003.

BOUDEWIJNS, M. et al. 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3469-70, 2006.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 2, p. 244-69, 2001.

BRAGA JÚNIOR, M. B. et al. Epidemiologic profile and satisfaction level of patients presenting musculoskeletal trauma assisted in a public emergency hospital in Brazil. **Acta Ortop Bras**, v. 13, n. 3, 2005.

BROUQUI, P.; RAOULT, D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 1, p. 177-207, 2001.

BROWN, T. A. **Genomes**. 2^a ed. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2002.

CAMELLO, T. C. F. et al. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil **Braz. j. microbiol**, v. 34, n. 1, p. 39-44, 2003.

CAMPBELL, J. I.; CIOFU, O.; HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the ampC-ampR genetic region. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 6, p. 1380-4, 1997.

CAPLAN, E. S.; HOYT, N. Infection surveillance and control in the severely traumatized patient. **Am J Med**, v. 70, n. 3, p. 638-40, 1981.

CARVALHO, R. H. D.; GONTIJO FILHO, P. P. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 623-630, 2008.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-9, 2007.

CLARRIDGE, J. E., 3RD. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 840-62, table of contents, 2004.

CLOUD, J. L. et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 578-84, 2004.

CLOUD, J. L. et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 400-6, 2002.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial disk susceptibility Tests, Approved Standard M2-A10. **Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute** v. 10 th, 2009.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1050-5, 1992.

COLLINS, M. D.; BURTON, R. A.; JONES, D. *Corynebacterium-Amycolatum* Sp-Nov a New Mycolic Acid-Less *Corynebacterium* Species from Human-Skin. **Fems Microbiology Letters**, v. 49, n. 3, p. 349-352, 1988.

COOK, A.; BERNE J.; NORWOOD, S. The incidence and complications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a community Level I trauma center. **J Trauma** v. 67 n.1, p. 102-107, 2009.

CORMICAN, M. G.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 8, p. 1880-4, 1996.

COUTO, R.; PEDROSA, T.; NOGUEIRA, J. **Infecção Hospitalar - Epidemiologia, Controle e tratamento**. 3^a. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2003.

DABBOUSSI, F. et al. Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal for *Pseudomonas cedrella* sp. nov. and *P. orientalis* sp. nov. **Res Microbiol**, v. 150, n. 5, p. 303-16, 1999.

DERVISOGLU, E. et al. Peritonitis due to *Pseudomonas putida* in a patient receiving automated peritoneal dialysis. **Infection**, v. 36, n. 4, p. 379-80, 2008.

DESHPANDE, L. M. et al. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). **Microb Drug Resist**, v. 12, n. 4, p. 223-30, 2006.

DRANCOURT, M.; BERGER, P.; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2197-202, 2004.

DRANCOURT, M. et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 10, p. 3623-30, 2000.

DUC LE, H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 4, p. 2161-71, 2004.

DUNNE, W. M., JR.; HARDIN, D. J. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 5945-9, 2005.

ECDC. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. **European Centre for Disease Prevention and Control**, 2010.

ESTEBAN, J. et al. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 18, n. 7, p. 518-21, 1999.

FOURNIER, P. E. et al. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5456-65, 2003.

FOX, G. E. et al. The Phylogeny of Prokaryotes. **Science**, v. 209, n. 4455, p. 457-463, 1980.

FUCHS, F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional. . In: (Ed.). 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-42, 1991.

FUNKE, G. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 1, p. 125-59, 1997.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 2, p. 90-8, 2009.

GARCIA-LEONI, M. E. et al. Ventilator-associated pneumonia in long-term ventilator-assisted individuals. **Spinal Cord**, v. 48, n. 12, p. 876-80, 2010.

GASTMEIER, P. et al. Repeated prevalence investigations on nosocomial infections for continuous surveillance. **J Hosp Infect**, v. 45, n. 1, p. 47-53, 2000.

GATSELIS, N. et al. Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 669-72, 2006.

GEE, J. E. et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 10, p. 4647-54, 2003.

GOTELLI, J. M. et al. A quality improvement project to reduce the complications associated with indwelling urinary catheters. **Urol Nurs**, v. 28, n. 6, p. 465-7, 473, 2008.

GOULD, I. M. Antibiotic policies and control of resistance. **Curr Opin Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 395-400, 2002.

HALL, L. et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1447-53, 2003.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSON, N. D.; SANDERS, C. C. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. **Curr Pharm Des**, v. 5, n. 11, p. 881-94, 1999.

HARBARTH, S. et al. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2916-21, 2000.

HARMSEN, D.; KARCH, H. 16S rDNA for Diagnosing Pathogens: a Living Tree. **ASM News**, v. 70, p. 19-24, 2004.

HARRIS, K. A.; HARTLEY, J. C. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 8, p. 685-91, 2003.

HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 50, n. 5, p. 241-6, 2003.

HAUSCHILD, T.; STEPANOVIC, S.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. **Syst Appl Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 183-7, 2010.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evol Biol**, v. 7, p. 64, 2007.

IVERSEN, C. et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 1442-7, 2008.

JACOBY, G.; BUSH, K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. **Lahey Clinic**, Burlington, 2011. Disponível em: < <http://www.lahey.org/Studies/> >. Acesso em: 4 Abr. 2011.

JAMULITRAT, S.; NARONG, M. N.; THONGPIYAPOOM, S. Trauma severity scoring systems as predictors of nosocomial infection. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 23, n. 5, p. 268-73, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2761-4, 2007.

JESUDASON, M. V.; KANDATHIL, A. J.; BALAJI, V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. **Indian J Med Res**, v. 121, n. 6, p. 780-3, 2005.

JONES, R. N. et al. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2007). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 3, p. 331-4, 2009.

JUAN, C. et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 474-8, 2010.

KERWAT, K.; GRAF, J.; WULF, H. [Nosocomial infections]. **Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, v. 45, n. 1, p. 30-1, 2010.

KIMURA, Y. et al. Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. **Clin Exp Nephrol**, v. 15, n. 1, p. 171-4, 2011.

KIRATISIN, P.; HENPRASERT, A. Resistance phenotype-genotype correlation and molecular epidemiology of *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* and *Serratia* that carry extended-spectrum beta-lactamases with or without plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in Thailand. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 1, p. 46-51, 2011.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H.; SMITH, R. F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and Its Subspecies. **Int J Syst Bacteriol**, v. 26, n. 1, p. 22-37, 1976.

KOLLEF, M.; NIEDERMAN, M. Antimicrobial resistance in the ICU: The time for action is now. **Crit Care Med**, v. 29, n. 4 Suppl, p. N63, 2001.

KOLLEF, M. H.; FRASER, V. J. Antibiotic resistance in the intensive care unit. **Ann Intern Med**, v. 134, n. 4, p. 298-314, 2001.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LAZARUS, H. M. et al. Trauma patient hospital-associated infections: risks and outcomes. **J Trauma**, v. 59, n. 1, p. 188-94, 2005.

LEE, M. Y. et al. '*Neisseria skkuensis*' sp. nov., isolated from the blood of a diabetic patient with a foot ulcer. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 7, p. 856-9, 2010.

LIEFTING, L. W. et al. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of *Phormium* yellow leaf phytoplasma. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 9, p. 3133-9, 1996.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 48 Suppl 1, p. 59-64, 2001.

LOGAN, N. A. et al. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. Pt 3, p. 953-66, 2002.

LOPEZ, A. B. et al. [Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review]. **Actas Urol Esp**, v. 33, n. 8, p. 909-12, 2009.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 15, n. 2-3, p. 155-73, 1994.

MACFARLANE, L.; OPPENHEIM, B. A.; LORRIGAN, P. Septicaemia and septic arthritis due to *Pseudomonas putida* in a neutropenic patient. **J Infect**, v. 23, n. 3, p. 346-7, 1991.

MADDEN, T. L. **The NCBI Handbook**. National Center for Biotechnology Information. MCENTYRE, J. e OSTELL, J. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) 2002.

MAGRET, M. et al. Ventilator-associated pneumonia in trauma patients is associated with lower mortality: results from EU-VAP study. **J Trauma**, v. 69, n. 4, p. 849-54, 2010.

MAKI, D. G.; TAMBYAH, P. A. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 342-7, 2001.

MAKSIMOVIC, J. et al. Surgical site infections in orthopedic patients: prospective cohort study. **Croat Med J**, v. 49, n. 1, p. 58-65, 2008.

MANGRAM, A. J. et al. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 20, n. 4, p. 250-78; quiz 279-80, 1999.

MARKOVIC-DJENIC, I. et al. [Etiology of surgical site infections at the orthopaedic trauma units]. **Acta Chir Jugosl**, v. 56, n. 2, p. 81-6, 2009.

MARSEGLIA, G. L. et al. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 1, p. 13-7, 2007.

MATHUR, P. Infections in traumatised patients: a growing medico-surgical concern. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 3, p. 212-6, 2008.

MENEZES, E. A. et al. Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 3, 2007.

METTLER, J. et al. Empirical use of antibiotics and adjustment of empirical antibiotic therapies in a university hospital: a prospective observational study. **BMC Infect Dis**, v. 7, p. 21, 2007.

MEYER, E. et al. Design of a surveillance system of antibiotic use and bacterial resistance in German intensive care units (SARI). **Infection**, v. 31, n. 4, p. 208-15, 2003.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **J Microbiol Methods**, v. 67, n. 3, p. 574-81, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº2616 de 12 de Maio de 1998. 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Homens representam 83% do total de mortos em acidentes e homicídios do país. 2010a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_ar ea=124&CO_NOTICIA=12002>. Acesso em: 14 Dez. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2009 : uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Brasília, 2010b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/29_11_10_saude_brasil_web.pdf>. Acesso em: 01 Jan. 2011.

MOHAMUDHA, P. R.; HARISH, B. N.; PARIJA, S. C. AmpC beta lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 596-602, 2010.

MORTARI, A. P. et al. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de β-lactamases do tipo AMP-C em isolados clínicos de Santa Maria – RS. **RBAC**, v. 40, n. 2, p. 147-149, 2008.

MOURA, M. E. B. **Infecção hospitalar no Piauí: a crítica e os aspectos críticos no processo de cuidar/cuidado (tese)**. Rio de janeiro. 2001. (Tese)

MOURA, M. E. B. et al. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. jul-ago; 60(4), p. 416-21., 2007.

MYLVAGANAM, S.; DENNIS, P. P. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. **Genetics**, v. 130, n. 3, p. 399-410, 1992.

NABER, C. K.; ERBEL, R. Diagnosis of culture negative endocarditis: novel strategies to prove the suspect guilty. **Heart**, v. 89, n. 3, p. 241-3, 2003.

NAKANO, N. et al. Mycobacterial infection of the musculoskeletal tissues: the use of pathological specimens for identification of causative species by PCR-direct sequencing of 16S rDNA. **Jpn J Infect Dis**, v. 63, n. 3, p. 188-91, 2010.

NCCLS, Ed. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard M2-A8**. Pennsylvania: NCCLS, v.23, 8^a Ed. ed. 2005.

NETO, J. L. E. S. et al. Infecção do trato urinário relacionada com a utilização do catéter vesical de demora: resultados da bactériuria e da microbiota estudadas. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 35, n. 1, p. 028-033, 2008.

NISHIMURA, Y. et al. Radiation sensitivities of *Acinetobacter* strains isolated from clinical sources. **J Basic Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 357-60, 1994.

NOGUEIRA, P. S. F. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. Enferm. UERJ**, v. 17(1), p. 96-101, 2009.

NORSKOV-LAURITSEN, N. Increased level of intragenomic 16S rRNA gene heterogeneity in commensal strains closely related to *Haemophilus influenzae*. **Microbiology**, 2011.

OLIVEIRA, A. C. et al. **Nosocomial infections and bacterial resistance in patients from a Teaching Hospital Intensive Care Unit**. Online Brazilian Journal of Nursing: Niterói. 6 2007.

OLIVIER, A.; LEE, H. Y.; COTE, J. C. Study of the heterogeneity of 16S rRNA genes in gamma-proteobacteria: implications for phylogenetic analysis. **J Gen Appl Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 395-405, 2005.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Infecção Hospitalar. 2000. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/sistema/fotos/hospitala1.PDF>>. Acesso em: 01 Jan. 2010.

OWENS, C. D.; STOESSEL, K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. **J Hosp Infect**, v. 70 Suppl 2, p. 3-10, 2008.

PAPIA, G. et al. Infection in hospitalized trauma patients: incidence, risk factors, and complications. **J Trauma**, v. 47, n. 5, p. 923-7, 1999.

PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Mol Diagn**, v. 6, n. 4, p. 313-21, 2001.

PATEL, M. H. et al. Antibiotic susceptibility pattern in urinary isolates of Gram negative bacilli with special reference to AmpC beta-lactamase in a tertiary care hospital. **Urol Ann**, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2010.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 8, p. 1108-14, 2007.

PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 6123-5, 2005.

PÓ, M. V. G., L.; CONTRERAS, L.; PAZ, S.; SILVA, R.F. O Controle de Infecção Hospitalar no Brasil e os Consumidores IDEC: , 2006.

POLK, H. C., JR.; CHRISTMAS, A. B. Prophylactic antibiotics in surgery and surgical wound infections. **Am Surg**, v. 66, n. 2, p. 105-11, 2000.

PORIES, S. E. et al. The epidemiologic features of nosocomial infections in patients with trauma. **Arch Surg**, v. 126, n. 1, p. 97-9, 1991.

PRADE, S. et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Rev Contr Infec Hosp**, v. 2, p. 11-24, 1995.

RAFI, W. et al. Rapid diagnosis of acute bacterial meningitis: role of a broad range 16S rRNA polymerase chain reaction. **J Emerg Med**, v. 38, n. 2, p. 225-30, 2010.

RAO, R. S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 4, p. 333-7, 2008.

RECINOS, G. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical intensive care unit. **Am Surg**, v. 75, n. 11, p. 1077-80, 2009.

RELMAN, D. A. et al. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. **N Engl J Med**, v. 323, n. 23, p. 1573-80, 1990.

RELMAN, D. A. et al. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. **N Engl J Med**, v. 327, n. 5, p. 293-301, 1992.

RODRIGUES, F. D. A.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1239-1247, 2010.

ROGERS, G. B. et al. Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3548-58, 2003.

ROLSTON, K. V. et al. Nonfermentative Gram negative bacilli in cancer patients: increasing frequency of infection and antimicrobial susceptibility of clinical isolates to fluoroquinolones. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. 215-8, 2005.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2004.

SAHA, R.; JAIN, S.; KAUR, I. R. Metallo beta-lactamase producing *Pseudomonas* species--a major cause of concern among hospital associated urinary tract infection. **J Indian Med Assoc**, v. 108, n. 6, p. 344-8, 2010.

SAHA, S. C.; CHOPADE, B. A. Radiation sensitivity of *Acinetobacter* spp. and their rediscidation for preservation of meat at low temperature. **Bangladesh Med Res Coun Bull**, v. 35, n. 2, p. 33-40, 2009.

SAINT, S.; LIPSKY, B. A. Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How? **Arch Intern Med**, v. 159, n. 8, p. 800-8, 1999.

SALTZHERR, T. P. et al. Complications in multitrauma patients in a Dutch level 1 trauma center. **J Trauma**, v. 69, n. 5, p. 1143-6, 2010.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E., JR. Type I beta-lactamases of Gram negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. **J Infect Dis**, v. 154, n. 5, p. 792-800, 1986.

SEIFERT, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 11, p. 2819-25, 1997.

SHIDA, O. et al. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, n. 4, p. 939-46, 1996.

SHITTU, A. et al. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 1, p. 51-5, 2004.

SIEMPOS, II et al. Predictors of mortality in adult patients with ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. **Shock**, v. 33, n. 6, p. 590-601, 2010.

SIMOES, M.; SIMOES, L. C.; VIEIRA, M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Res**, v. 43, n. 1, p. 229-37, 2009.

SINGHI, S. C.; BARANWAL, A. Probiotic use in the critically ill. **Indian J Pediatr**, v. 75, n. 6, p. 621-7, 2008.

STAMM, A. M. N. D. F. et al. Cateterização Vesical e Infecção do Trato Urinário: Estudo de 1.092 Casos. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 2, 2006.

STEPANOVIC, S. et al. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5262-4, 2003.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-8, 2001.

SUN, Y. et al. ABCGrid: Application for Bioinformatics Computing Grid. **Bioinformatics**, v. 23, n. 9, p. 1175-7, 2007.

TALHA, K. A. et al. Organisms associated with ventilator associated pneumonia in intensive care unit. **Mymensingh Med J**, v. 18, n. 1 Suppl, p. S93-97, 2009.

TANEJA, N. et al. Occurrence of ESBL & Amp-C beta-lactamases & susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. **Indian J Med Res**, v. 127, n. 1, p. 85-8, 2008.

TANG, Y. W. et al. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 1676-8, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW:Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TREVINO, M. et al. Nosocomial infection by VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida*. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 7, p. 853-5, 2010.

TURNER, P. J. et al. The MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) programme. **Int J Antimicrob Agents**, v. 13, n. 2, p. 117-25, 1999.

TURRINI, R. N. T. S., A.H. Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 6, p. 485-490, 2002.

UEDA, K. et al. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **J Bacteriol**, v. 181, n. 1, p. 78-82, 1999.

USDA. NRRL B-1157. 2011. Disponível em: <<http://www.straininfo.net/strains/33936/browser#>>. Acesso em: 17 de Abril de 2011.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 17, p. 3381-91, 1996.

VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. . **N Engl J Med**, v. 344, n. 1, p. 11-6, 2001.

VON GRAEVENITZ, A. et al. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 7, p. 2087-8, 1998.

WAISELFISZ, J. J. **Mapa da Violência 2011: Os Jovens do Brasil**. ANDRADE, F. D.;COTRIM, M., et al. São Paulo: Instituto Sangari 2011.

WALLET, F. et al. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Scand J Infect Dis**, v. 32, n. 6, p. 697-8, 2000.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis and identification of *Shigella* spp. by molecular probes. **Mol Cell Probes**, v. 11, n. 6, p. 427-32, 1997.

WAYNE, L. G. et al. Semantide- and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International

Working Group on Mycobacterial Taxonomy. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, n. 1, p. 280-97, 1996.

WEBER, D. J. et al. Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, n. 7, p. 825-31, 2007.

WILCK, M. B. et al. Endocarditis caused by culture-negative organisms visible by Brown and Brenn staining: utility of PCR and DNA sequencing for diagnosis. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 5, p. 2025-7, 2001.

WINN, W. et al. **Koneman, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 3, p. 690-7, 2000.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WONG, J. S. et al. *Corynebacterium accolens*-associated pelvic osteomyelitis. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 654-5, 2010.

WOO, P. C. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 10, p. 908-34, 2008.

WOO, P. C. et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1996-2001, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on road safety: time for action. **World Health Organization**, Geneva, 2009. Disponível em: < www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2009 >. Acesso em: 12 Jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Switzerland, 2001. Disponível em: < http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_2_E_N/en >. Acesso em: 12 Jan. 2011.

WORRALL, C. L. et al. Impact of a hospital-acquired/ventilator-associated/healthcare-associated pneumonia practice guideline on outcomes in surgical trauma patients. **J Trauma**, v. 68, n. 2, p. 382-6, 2010.

WU, S. et al. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. **Microb Drug Resist**, v. 2, n. 4, p. 435-41, 1996.

YATES, R. R. New intervention strategies for reducing antibiotic resistance. **Chest**, v. 115, n. 3 Suppl, p. 24S-27S, 1999.

YOSHINO, Y. et al. *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. **J Infect Chemother**, v. 17, n. 2, p. 278-82, 2011.

YUSUPOV, M. M. et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. **Science**, v. 292, n. 5518, p. 883-96, 2001.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuênci à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu, , tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo “Vigilância Epidemiológica na Unidade de Emergência do Agreste: Implantação de Serviço de Epidemiologia Molecular e Criação de Banco de Dados Informatizado para sequências de rDNA 16S de bactérias patogênicas.”, recebi do Sr. Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade ou o Sr. Daniel Gomes Coimbra, do Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, responsáveis por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a investigar quais os agentes infecciosos (bactérias) responsáveis pelos casos de infecção hospitalar na Unidade de Emergência do Agreste (UEA). A infecção hospitalar é caracterizada pela infecção adquirida durante o período de hospitalização.
- Que a importância deste estudo é a de melhorar os serviços de saúde e a qualidade de atendimento dos pacientes.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: fazer um levantamento dos tipos de bactérias que causam doença (infecção hospitalar) na UEA; criar um serviço especializado e moderno para identificação e controle destas bactérias. Os resultados desta pesquisa podem ajudar no controle das infecções hospitalares, criando condições para que outras pessoas tenham menores riscos de contaminação.
- Que esse estudo começará em março de 2008 e terminará em março/2010.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Serão coletadas amostras de material biológico, como sangue, urina ou secreções, dos pacientes internos na UEA. A coleta de sangue será feita em um dos braços por punção venosa (retirada de sangue pela veia do braço com agulha) realizada com material descartável por profissional treinado. Serão retirados, se necessário, no máximo, 15 mL do meu sangue. Este volume de sangue é cerca de 30 (trinta) vezes menor do que o volume de sangue normalmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Se necessário, a coleta de secreções (“pus”, “catarro”) será feita com materiais plásticos adequados, de maneira indolor (sem causar dor). Se necessário, a coleta de urina será feita em frascos de coleta. Estas amostras serão submetidas à análise em laboratório para identificação da bactéria causadora da infecção, utilizando métodos modernos de biologia molecular e análise de informática.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Participarei durante a coleta através da doação de material biológico (sangue, urina ou secreções). Com isto, encerra-se a minha participação neste estudo.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são os seguintes: não existem outros meios para se obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: O desconforto da coleta de sangue é dor leve e passageira e/ ou possível aparecimento de mancha roxa no local.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: A participação neste estudo não trará nenhum risco à minha saúde física e mental.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Garantia de que serei devidamente acompanhado (a) e assistido (a) durante todo o período de participação no projeto, sem gastos adicionais, bem como de que será garantida a continuidade do tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa, sendo responsável por ela: a equipe multidisciplinar de saúde da Unidade de Emergência do Agreste.

- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: tratamento adequado para eliminar a possível bactéria responsável pela infecção e o aperfeiçoamento dos serviços de identificação e controle de infecção hospitalar.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: serei acompanhado pela equipe de saúde e pelo pesquisador responsável durante a coleta de material e pela equipe médica da UEA durante o tratamento.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do(a) participante-voluntário(a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Endereço do(s) responsável(is) pela pesquisa:

Instituição: Universidade Federal de Alagoas-UFAL Campus Arapiraca

Endereço: Rodovia AL 115, Km 6.5

CEP: 57300-970. Arapiraca-AL

Telefones p/contato: 82- 99930097

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:

Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária

Telefone: 3214-1053

Arapiraca,

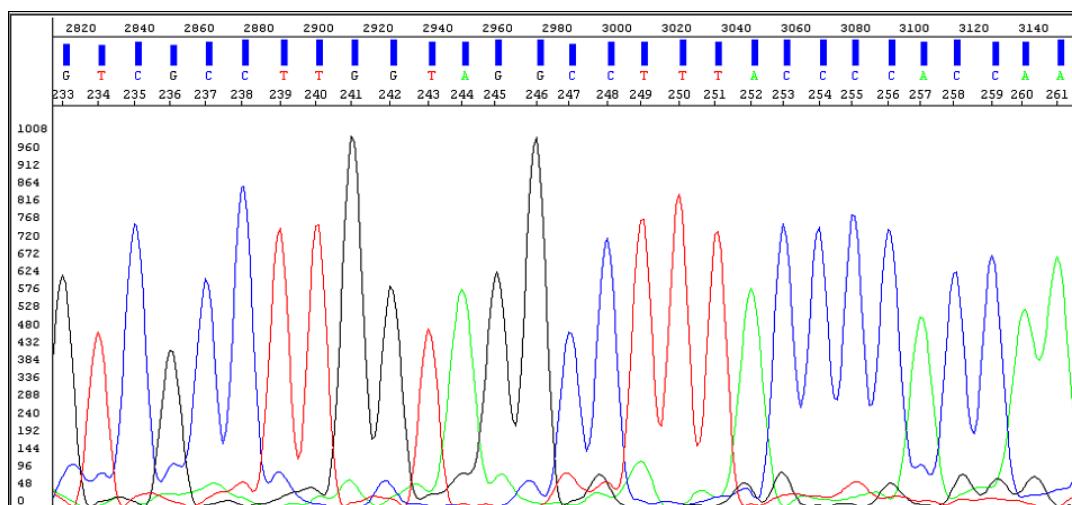
(Assinatura ou impressão datiloscópica do(a) voluntário(a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do responsável pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

Apêndice B - Microrganismos e Códigos das Sequências do GenBank Selecionados para Criação de Sequências Consenso para Cada Espécie

<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella sonnei</i>
CP000802.1 GU415761.1 AP010958.1 CU928145.2 FM883659.1 CP000948.1	EU009186.1 CP000034.1	AE014073.1 CP001383.1 EU009188.1 AE005674.1 EU009187.1	CP000036.1 CP001063.1	CP000038.1 EU009194.1
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HQ407292.1 FM883657.1 FM883660.1 AY310730.1 EU196396.1 EU196376.1	AB244457.1 FP929040.1 Y17665.1	AB274292.1 AB274296.1 AB274290.1	FM883666.1 FM883665.1 AM947037.1 FM883661.1	AP006725.1 CP000964.1 CP000647.1 FJ823263.1 NC_012731.1
<i>Klebsiella granulomatis</i>	<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EU333881.1 DQ112323.1	CP001891.1	EU693931.1 AY873801.1 FM992868.1 GU003832.1	FJ608004.1 AB435615.1 EF208031.1	CP000094.2 AM181176.4 CP000076.1

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice C - Eletroferograma Produzido pelo Aparelho ABI 310, a Partir da Amostra 01-10/08.



Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice D - BLASTn em Banco de Dados NCBI (GenBank), Indicando *P. aeruginosa* com Maior Pontuação (Max Score).

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HM803170.1	Pseudomonas aeruginosa strain ANT 04 16S ribosomal RNA gene	857	857	100%	0.0	99%
HQ023428.1	Pseudomonas aeruginosa strain MZA-85 16S ribosomal RNA gene	857	857	100%	0.0	99%
DQ989211.2	Pseudomonas aeruginosa isolate IL1 16S ribosomal RNA gene	857	857	100%	0.0	99%
AB247194.1	Pseudomonas aeruginosa gene for 16S rRNA, partial sequence	857	857	100%	0.0	99%
GU414595.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1150 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414591.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1146 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414590.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1145 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414588.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1143 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414586.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1141 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414585.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1140 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414584.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1139 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414582.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1137 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414581.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1136 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414579.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1134 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414577.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1132 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414574.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1129 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU414570.1	Pseudomonas aeruginosa clone CMC1102 16S ribosomal RNA gene	856	856	99%	0.0	99%
GU377058.1	Pseudomonas sp. DQ2(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	854	854	99%	0.0	99%
FJ887887.1	Pseudomonas aeruginosa strain TP2 16S ribosomal RNA gene	854	854	99%	0.0	99%
AY486363.1	Pseudomonas aeruginosa strain AU3477 16S ribosomal RNA gene	854	854	99%	0.0	99%
AJ410284.1	Pseudomonas sp. EVA8 partial 16S rRNA gene, strain EVA8	854	854	99%	0.0	99%
AJ410283.1	Pseudomonas sp. EVA7 partial 16S rRNA gene, strain EVA7	854	854	99%	0.0	99%
AJ410281.1	Pseudomonas sp. EVA5 partial 16S rRNA gene, strain EVA5	854	854	99%	0.0	99%
FR773714.1	Pseudomonas aeruginosa partial 16S rRNA gene, strain ARB001	852	852	99%	0.0	99%
HQ018745.1	Pseudomonas aeruginosa strain ASFP-37 16S ribosomal RNA gene	852	852	100%	0.0	99%
HQ454082.1	Pseudomonas sp. 74i 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	100%	0.0	99%
HQ609597.1	Pseudomonas sp. DG1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	100%	0.0	99%

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice E - BLASTn em Banco de Dados RDP II, Indicando *P. aeruginosa* com Maior Pontuação (*S_ab score*).

Query Sequence: S000011066 AB037547.1:1..1526, 1446 unique oligos
Match hit format: short ID, orientation, similarity score, <i>S_ab score</i> , unique common oligomers and sequence full name. More help is available.
Lineage:
<ul style="list-style-type: none"> no rank Root (8/20/425489) (selected/match/total RDP sequences) domain Bacteria (8/20/417533) phylum Proteobacteria (8/20/122057) class Gammaproteobacteria (8/20/52301) order Pseudomonadales (8/20/18447) family Pseudomonadaceae (8/20/13389) genus Pseudomonas (8/20/13065) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> S000000739 0.999 0.999 1431 Pseudomonas aeruginosa; #885; AB037555 <input checked="" type="checkbox"/> S000000939 0.999 0.998 1441 Pseudomonas aeruginosa; #796; AB037553 <input checked="" type="checkbox"/> S000002377 0.999 0.994 1459 Pseudomonas aeruginosa; AL98; AJ249451 <input type="checkbox"/> S000004991 0.999 0.994 1434 Pseudomonas aeruginosa; #777; AB037549 <input checked="" type="checkbox"/> S000006498 0.999 0.999 1438 Pseudomonas aeruginosa; H103; AB037559 <input type="checkbox"/> S000007639 0.999 0.994 1431 Pseudomonas aeruginosa; #985; AB037556 <input type="checkbox"/> S000007641 0.999 0.995 1438 Pseudomonas aeruginosa; H706; AB037561 <input checked="" type="checkbox"/> S000007642 0.999 0.999 1439 Pseudomonas aeruginosa; H707; AB037562 <input checked="" type="checkbox"/> S000009139 0.999 0.999 1438 Pseudomonas aeruginosa; CP-1; AB037558 <input checked="" type="checkbox"/> S000011066 1.000 1.000 1446 Pseudomonas aeruginosa; #129; AB037547 <input checked="" type="checkbox"/> S000011470 0.999 0.994 1439 Pseudomonas aeruginosa; #797; AB037554 <input type="checkbox"/> S000012976 0.999 0.999 1431 Pseudomonas aeruginosa; #783; AB037551 <input type="checkbox"/> S000015601 0.999 0.998 1434 Pseudomonas aeruginosa; #649; AB037548

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice F - Criação de Sequência Consenso de *E. coli* Através de CLUSTALW, Mostrando as Diferenças entre as Sequências Depositadas no GenBank.

	75	80	85	90	95	205	210	215	250	255	270	275
CP000802.1
GU415761.1
AP010958.1
CU928145.2
FM883659.1
CP000948.1
Consenso

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice G - Alinhamento Múltiplo de Sequências Consenso de Enterobactérias. São Mostradas as Diferenças Entre as Sequências e a Dificuldade na Distinção Entre *E. coli* e as Outras Espécies, ao Se Utilizar o Sequenciamento Parcial. Código de Nucleotídeos no Apêndice H.

	15	20	65	70	80	90	100					
<i>E. coli</i>
<i>S. dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>
<i>S. boydii</i>
<i>E. cancerogenus</i>
<i>E. cloacae</i>
<i>E. sakazakii</i>
<i>E. hormaechei</i>
	180	185	205	210	225	230	250	260	270			
<i>E. coli</i>
<i>S. dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>
<i>S. boydii</i>
<i>E. cancerogenus</i>
<i>E. cloacae</i>
<i>E. sakazakii</i>
<i>E. hormaechei</i>
	450	460	470	480	490							
<i>E. coli</i>
<i>S. dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>
<i>S. boydii</i>
<i>E. cancerogenus</i>
<i>E. cloacae</i>
<i>E. sakazakii</i>
<i>E. hormaechei</i>

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice H - Códigos Utilizados Para Descrição dos Nucleotídeos nas Sequências.

Código	Significado
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
B	C, G ou T
D	A, G ou T
H	A, C ou T
R	A ou G (puRina)
Y	C ou T (pYrimidina)
K	G ou T (Keto)
M	A ou C (aMino)
S	G ou C (Strong – 3H bonds)
W	A ou T (Weak – 2H bonds)
N	aNy base
V	A, C ou G

Fonte: (Autor, 2011).

Apêndice I – Sequência de Nucleotídeos das Amostras Não Identificadas por BLASTn em Bancos Genéticos, Alinhadas por CLUSTALW Para Distinção Entre os Microrganismos. *E. coli*, Espécies de *Shigella* e *Enterobacter* São Sequências Consenso Para Comparação.

Sequence alignment of the 16S rRNA gene across various *Escherichia coli* strains. The alignment shows the sequence from position 430 to 560. Strains are color-coded: *E. coli* (red), *S. dysenteriae* (blue), *S. flexneri* (green), *S. sonnei* (orange), *S. boydii* (purple), *E. cancerogenus* (yellow), *E. cloacae* (pink), *E. sakazakii* (brown), and *E. hormaechei* (grey). The alignment highlights conserved regions in black and variable regions in grey.

Apêndice J – Sequências de Nucleotídeos das Amostras Identificadas Por BLASTn em Bancos Genéticos, Somente Aquelas Pertencentes ao Gênero *Klebsiella*. Alinhamento Por CLUSTALW Para Distinção Entre as Espécies com Sequências Consenso.

	10	20	30	40	50	60	70
<i>K. pneumoniae</i>
6-11-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7-8	-----	-----	AGATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
16-9-8	-----	-----	AGA-TGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
21-3-9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-9-9	-----	-----	-----	CTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----
25-10-1-9	-----	-----	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
3-11-1-9	-----	-----	-----	TGAACGCTGGCGCAGGCAGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----
4-1-2-10	-----	-----	AGAGTTTGATCATG-CTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
7-1-2-10	-----	-----	-----	AGA-TGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----
8-11-2-9	-----	-----	-----	GCTCAGAT-GAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----
<i>K. variicola</i>	-----	-----	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
<i>K. granulomatis</i>	-----	-----	AGAGGTTTTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	-----	-----	-----	-----
<i>K. oxytoca</i>	-----	-----	TTTARRRKTTGATCMTGGCTCAGATTGAACGCTGGCKGRSGSCTAMCACATGCAAGTCGAACGGT	-----	-----	-----	-----
	80	90	100	110	120	130	140
<i>K. pneumoniae</i>
6-11-8	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7-8	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16-9-8	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
21-3-9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-9-9	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
25-10-1-9	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3-11-1-9	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4-1-2-10	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-1-2-10	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8-11-2-9	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. variicola</i>	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. granulomatis</i>	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. oxytoca</i>	AGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCGGAAACTGCCTGATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	150	160	170	180	190	200	210
<i>K. pneumoniae</i>
6-11-8	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAYGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7-8	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16-9-8	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
21-3-9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-9-9	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
25-10-1-9	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3-11-1-9	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4-1-2-10	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-1-2-10	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8-11-2-9	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. variicola</i>	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. granulomatis</i>	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. oxytoca</i>	AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	220	230	240	250	260	270	280
<i>K. pneumoniae</i>
6-11-8	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7-8	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16-9-8	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
21-3-9	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-9-9	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
25-10-1-9	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3-11-1-9	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4-1-2-10	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-1-2-10	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8-11-2-9	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. variicola</i>	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. granulomatis</i>	GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>K. oxytoca</i>	GCCTCTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTAGGGTAACGGCTCACCTAGGCAGCGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	290	300	310	320	330	340	350
K. pneumoniae
6-11-8	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
2-7-8	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
16-9-8	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
21-3-9	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
7-9-9	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
25-10-1-9	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
3-11-1-9	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
4-1-2-10	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
7-1-2-10	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
8-11-2-9	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
K. variicola	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
K. granulomatis	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
K. oxytoca	TCCCCTAGCTGGTCTGAAGGGATGACCAGCCAC	ACTGGAACTGAGACACGG	TCCAGACTCCTACGGGAGGC				
	360	370	380	390	400	410	420
K. pneumoniae
6-11-8	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
2-7-8	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
16-9-8	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
21-3-9	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
7-9-9	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
25-10-1-9	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
3-11-1-9	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
4-1-2-10	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
7-1-2-10	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
8-11-2-9	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
K. variicola	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
K. granulomatis	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
K. oxytoca	AGCAGTGGGAATATTGCACAAATGGCGAACGCTGATGCAGCCATGCGCGTGTGTAAGAAGGCC	TC					
	430	440	450	460	470	480	490
K. pneumoniae
6-11-8	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGKTRAGGT	TAATAAACCTYRKCGATTGACGTTACCGC					
2-7-8	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCG	-----					
16-9-8	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	-ATAAACCAACGGCGAGAG					
21-3-9	GGGT-GTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGATAAAGGT	-ATAAACCTGGCGATTGACGT-ACCGC					
7-9-9	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	TA					
25-10-1-9	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	TAATAAACCTCATCGATTGACGTTACCGC					
3-11-1-9	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	TAATAAACCTCATCGATTGACGTTACCGC					
4-1-2-10	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	TAATAAACCTCATCGATTGACGTTACCGC					
7-1-2-10	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGCTGAGGT	TAATAAACCTCATCGATTGACGTTACCGC					
8-11-2-9	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGATGAGGT	TAATAAACCTCGTCGAT-GACGT-ACCGC					
K. variicola	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGATGAGGT	TAATAAACCTCATCGATTGACGTTACCGC					
K. granulomatis	GGGTTGTAAAGCACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGCCGWTAAAGGT	TAATAAACCTTGKCGATTGACGTTACCGC					
K. oxytoca	GGGTTGTAAAGTACTTTCAAGCGGGGAGGAAGGSRRTAAGGT	TAATAAACCTTGTGCGRTTSAYGTYWMCCG					
	500	510					
K. pneumoniae					
6-11-8	AGAAGAAGCACCGGCTAACTCC						
2-7-8	-----						
16-9-8	-----						
21-3-9	AGAAGAAGC	-----					
7-9-9	AGAAGAAGC	-----					
25-10-1-9	AGAAGAAGCACCGGCTA-TCC-						
3-11-1-9	AGAAGAAGCACCGG	-----					
4-1-2-10	AGAAGAAGCACCGGCTA	-----					
7-1-2-10	AGAAGAAGCACCGG	-----					
8-11-2-9	AGAAGAAGCACCG	-----					
K. variicola	AGAAGAAGCACCGGCTAACTCC						
K. granulomatis	AGAAGAAGCACCGGCTAACTCC						
K. oxytoca	ARMMGAAGCACCGGCTAACTCC						

Apêndice K – Números de Acesso das Sequências Depositadas no GenBank, Códigos de Acesso em Bacterioteca e Identificação dos Microrganismos.

Código	Nº Acesso	Microrganismo
5-3-8	JF919830	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8-6-8	JF919831	<i>Acinetobacter baumannii</i>
11-7-8	JF919832	<i>Acinetobacter baumannii</i>
12-7-8	JF919833	<i>Acinetobacter baumannii</i>
14-8-8	JF919834	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2-10-8	JF919835	<i>Acinetobacter baumannii</i>
17-10-8	JF919836	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7-11-2-8	JF919837	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2-3-2-9	JF919838	<i>Acinetobacter baumannii</i>
3-3-9	JF919839	<i>Acinetobacter baumannii</i>
13-3-2-9	JF919840	<i>Acinetobacter baumannii</i>
1-5-9	JF919841	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4-5-9	JF919842	<i>Acinetobacter baumannii</i>
5-5-2-9	JF919843	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2-6-1-9	JF919844	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8-6-9	JF919845	<i>Acinetobacter baumannii</i>
9-6-1-9	JF919846	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10-6-1-9	JF919847	<i>Acinetobacter baumannii</i>
15-6-1-9	JF919848	<i>Acinetobacter baumannii</i>
16-6-2-9	JF919849	<i>Acinetobacter baumannii</i>
5-9-9	JF919850	<i>Acinetobacter baumannii</i>
9-9-1-9	JF919851	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10-9-1-9	JF919852	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7-10-9	JF919853	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10-10-9	JF919854	<i>Acinetobacter baumannii</i>
22-10-1-9	JF919855	<i>Acinetobacter baumannii</i>
27-10-9	JF919856	<i>Acinetobacter baumannii</i>
28-10-9	JF919857	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4-12-9	JF919858	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8-12-9	JF919859	<i>Acinetobacter baumannii</i>
10-12-2-9	JF919860	<i>Acinetobacter baumannii</i>
5-1-10	JF919861	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8-1-10	JF919862	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4-1-1-10	JF919863	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7-1-1-10	JF919864	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7-2-10	JF919865	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2-2-1-10	JF919866	<i>Acinetobacter baumannii</i>
1-3-10	JF919867	<i>Acinetobacter baumannii</i>
9-12-9	JF919868	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
5-3-1-9	JF919869	<i>Bacillus clausii</i>
10-11-8	JF919870	<i>Brevibacillus agri</i>
6-3-2-8	JF919871	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
6-8-8	JF919872	<i>Corynebacterium striatum</i>
2-3-1-9	JF919873	<i>Corynebacterium striatum</i>
6-2-10	JF919874	<i>Corynebacterium striatum</i>
9-10-9	JF919894	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
23-10-9	JF919895	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
1-11-1-9	JF919883	<i>Enterobacter cloacae</i>
4-3-2-8	JF919884	<i>Enterococcus faecalis</i>
3-6-2-9	JF919885	<i>Enterococcus faecalis</i>
12-11-1-9	JF919886	<i>Enterococcus faecalis</i>
8-2-1-10	JF919887	<i>Enterococcus faecalis</i>
8-9-9	JF919888	<i>Enterococcus gallinarum</i>
4-3-1-8	JF919889	<i>Enterobacter hormaechei</i>
9-9-8	JF919890	<i>Enterobacter hormaechei</i>
8-11-1-9	JF919891	<i>Enterobacter hormaechei</i>
12-11-2-9	JF919892	<i>Enterobacter hormaechei</i>
13-3-3-9	JF919893	<i>Enterobacter hormaechei</i>
6-9-8	JF920016	<i>Enterobacter sp.</i>
3-6-1-9	JF920017	<i>Enterobacter sp.</i>
10-6-2-9	JF920018	<i>Enterobacter sp.</i>
30-9-2-9	JF920019	<i>Enterobacter sp.</i>

Código	Nº Acesso	Microrganismo
29-10-2-9	JF920020	<i>Enterobacter sp.</i>
3-11-2-9	JF920021	<i>Enterobacter sp.</i>
2-12-2-9	JF920022	<i>Enterobacter sp.</i>
8-8-8	JF920023	<i>Enterobacter sp.</i>
8-9-8	JF920024	<i>Enterobacter sp.</i>
5-6-8	JF920026	<i>Enterobacteriaceae</i>
12-8-8	JF920027	<i>Enterobacteriaceae</i>
20-10-8	JF920028	<i>Enterobacteriaceae</i>
12-11-1-8	JF920029	<i>Enterobacteriaceae</i>
11-8-8	JF919875	<i>Escherichia coli</i>
19-10-8	JF919876	<i>Escherichia coli</i>
32-10-8	JF919877	<i>Escherichia coli</i>
1-3-9	JF919878	<i>Escherichia coli</i>
1-2-10	JF919879	<i>Escherichia coli</i>
18-10-8	JF919880	<i>Escherichia coli</i>
20-10-1-9	JF919881	<i>Escherichia coli</i>
33-10-9	JF919882	<i>Escherichia coli</i>
2-7-8	JF919896	<i>Klebsiella granulomatis</i>
21-3-9	JF919897	<i>Klebsiella granulomatis</i>
2-4-8	JF919898	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3-6-8	JF919899	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4-8-8	JF919900	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13-8-8	JF919901	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16-8-8	JF919902	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4-9-8	JF919903	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5-9-8	JF919904	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4-10-8	JF919905	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25-10-8	JF919906	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6-3-9	JF919907	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9-3-2-9	JF919908	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9-5-9	JF919909	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
17-9-1-9	JF919910	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
19-9-9	JF919911	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
20-9-2-9	JF919912	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
21-9-9	JF919913	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
26-9-9	JF919914	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
30-9-1-9	JF919915	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
41-9-9	JF919916	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8-10-1-9	JF919917	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15-10-2-9	JF919918	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
20-10-2-9	JF919919	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8-2-2-10	JF919920	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10-3-10	JF919921	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16-9-8	JF919922	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7-9-9	JF919923	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25-10-1-9	JF919924	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3-11-1-9	JF919925	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8-11-2-9	JF919926	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4-1-2-10	JF919927	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7-1-2-10	JF919928	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6-11-8	JF920025	<i>Klebsiella sp.</i>
2-3-8	JF919929	<i>Morganella morganii</i>
2-9-8	JF919930	<i>Morganella morganii</i>
3-9-8	JF919931	<i>Morganella morganii</i>
1-4-2-8	JF919932	<i>Proteus mirabilis</i>
5-11-1-8	JF919933	<i>Proteus mirabilis</i>
42-9-9	JF919934	<i>Proteus mirabilis</i>
22-10-2-9	JF919935	<i>Proteus mirabilis</i>
2-5-2-9	JF919984	<i>Providencia stuartii</i>
1-6-2-9	JF919985	<i>Providencia stuartii</i>
3-3-2-8	JF919936	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1-4-1-8	JF919937	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Código	Nº Acesso	Microrganismo
5-8-8	JF919938	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15-8-8	JF919939	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7-9-8	JF919940	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1-10-8	JF919941	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5-10-8	JF919942	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6-10-8	JF919943	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9-10-8	JF919944	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
14-10-8	JF919945	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15-10-8	JF919946	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16-10-1-8	JF919947	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
26-10-8	JF919948	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
28-10-8	JF919949	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
29-10-8	JF919950	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
33-10-8	JF919951	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
34-10-8	JF919952	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3-11-8	JF919953	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7-11-1-8	JF919954	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8-11-8	JF919955	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9-11-8	JF919956	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5-3-2-9	JF919957	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8-3-9	JF919958	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2-5-1-9	JF919959	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3-5-2-9	JF919960	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5-5-1-9	JF919961	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10-5-9	JF919962	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11-5/9	JF919963	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12-5/9	JF919964	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1-6-1-9	JF919965	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5-6-2-9	JF919966	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6-6-9	JF919967	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15-6-2-9	JF919968	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16-6-1-9	JF919969	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9-9-2-9	JF919970	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10-9-2-9	JF919971	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16-9-9	JF919972	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17-9-2-9	JF919973	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20-9-1-9	JF919974	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27-9-9	JF919975	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8-10-2-9	JF919976	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16-10-9	JF919977	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Código	Nº Acesso	Microrganismo
25-10-2-9	JF919978	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3-12-9	JF919979	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10-12-1-9	JF919980	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3-2-10	JF919981	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
13-11-1-8	JF919982	<i>Pseudomonas cedrina</i>
13-3-1-9	JF919983	<i>Pseudomonas putida</i>
5-6-1-9	JF920006	<i>Serratia marcescens</i>
19-6-1-9	JF920007	<i>Serratia marcescens</i>
27-10-8	JF920012	<i>Serratia marcescens</i>
31-10-8	JF920013	<i>Serratia marcescens</i>
7-3-8	JF919986	<i>Staphylococcus aureus</i>
1-7-8	JF919987	<i>Staphylococcus aureus</i>
6-7-8	JF919988	<i>Staphylococcus aureus</i>
17-9-8	JF919989	<i>Staphylococcus aureus</i>
8-10-8	JF919990	<i>Staphylococcus aureus</i>
10-10-8	JF919991	<i>Staphylococcus aureus</i>
13-10-8	JF919992	<i>Staphylococcus aureus</i>
4-11-8	JF919993	<i>Staphylococcus aureus</i>
7-11-3-8	JF919994	<i>Staphylococcus aureus</i>
2-6-2-9	JF919995	<i>Staphylococcus aureus</i>
9-6-2-9	JF919996	<i>Staphylococcus aureus</i>
18-9-1-9	JF919997	<i>Staphylococcus aureus</i>
2-11-9	JF919998	<i>Staphylococcus aureus</i>
3-11-3-9	JF919999	<i>Staphylococcus aureus</i>
2-12-1-9	JF920000	<i>Staphylococcus aureus</i>
9-2-10	JF920001	<i>Staphylococcus aureus</i>
2-3-1-10	JF920002	<i>Staphylococcus aureus</i>
3-7-8	JF920003	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
12-10-8	JF920004	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13-10-9	JF920005	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1-11-1-8	JF920008	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
5-12-9	JF920009	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
9-8-8	JF920010	<i>Staphylococcus hominis</i>
5-2-10	JF920011	<i>Staphylococcus hominis</i>
18-6-9	JF920014	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
3-3-1-8	JF748725	<i>Staphylococcus sciuri</i>
21-10-8	JF920015	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Apêndice L - Artigo Aprovado para Publicação no Periódico Científico *New Microbiologica*

Wound Infection by Multiresistant *Staphylococcus sciuri* Identified by Molecular Methods.

Mr. Daniel G. Coimbra^a

Ms. Alda G.C.S. Almeida ^a

Mr. Jorge B.O. Júnior ^a

Dr. Luiz A.F. da Silva ^b

Ms. Beatriz J. Pimentel ^c

Dr. Daniel L.G. Gitaí ^b

Dr. Luciana S. Moreira ^d

Dr. Eurípedes A. Silva-Filho ^b

Dr. Tiago G. de Andrade ^{*a}

*(Corresponding author) E-mail address: deandrade.tiago@pq.cnpq.br

^aUniversidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca/AL

AL 115, Km 6,5 , Bom Sucesso, Arapiraca-Alagoas,

Brasil – CEP:57300-970

Telephone number: +55-82-3482-1804

^bUniversidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió/AL

^cSecretaria Municipal de Saúde, Vigilância Epidemiológica, Maceió/AL

^dUniversidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió/AL

ABSTRACT

We report a case of wound infection by multidrug-resistant *Staphylococcus sciuri* in a patient at a hospital of injuries from the agreste of Alagoas, Brazil, identified through broad-spectrum PCR and sequencing of 16S rDNA gene. Due to its high resistance profile, it was characterized as methicillin-resistant *Staphylococcus* presenting sensitive only to vancomycin and chloramphenicol. The injury resulting from trauma associated with infection resulted in amputation of the infected limb.

KEYWORDS: *Staphylococcus sciuri*, wound infection, 16S rDNA.

CASE REPORT

The wound infection is the most common infectious disease in hospitals that care for trauma cases. These infections can be caused by several types of bacterial agents among Gram positive and negative. The incidence of coagulase-negative *Staphylococcus* involved in hospital infections has increased substantially with the advent of more invasive technologies in the hospital environment and the development of resistance by microorganisms.

Herein we describe a case of a 30 year-old man victim of trampling by a motorcycle that was referred to the Agreste's Emergency Unit - Alagoas, Brazil. He suffered multiple injuries, with two major injuries in posterior and lateral regions of the right leg. He was undergone to vascular and intestinal surgeries in the same day he arrived the hospital. It was made use of empirical therapy with ciprofloxacin (400mg 12-12h) and metronidazole (500 mg 8-8h).

Haematological analyzes showed 4.3 g/dL, hemoglobin level, $12.5 \times 10^9/L$ leukocytes, 10.6×10^9 neutrophil and platelet counts at normal levels. Two red blood cells concentrates were used to compensate the anemia. Two days after admission he had fever and complained of intense pain in his right leg. The presence of pus secretion in his leg was indicative of infection. Surgical debridement was indicated for removal of necrotic lesions. Before surgical procedures, samples of pus secretion were collected for laboratory analysis. The clinical reports associated with necrosis reaching the fascia, and the surgical findings of low adhesion of subcutaneous tissue allowed the establishment of the diagnosis of necrotizing fasciitis. Even after the debridement, the patient remained with fever, infected wound and still complaining of severe pain. The extensive muscle involvement resulting from the traumatic injury associated with the infection resulted in limb amputation. Amikacin (1g 24/24h), oxacillin (2g 6/6h) and ceftriaxone (1g 12/12h) were used as prophylactic therapy to surgery.

Samples collected were plated on Columbia agar (Himedia) with 5% sheep blood and incubated at 35°C with 5% CO_2 . They were also inoculated into BHI (Himedia) and MacConkey agar (Acumedia), with incubation at 35°C . Secretion's bacterioscopy showed many Gram positive cocci and rare Gram negative bacilli. Preliminary tests were performed on the basis of colonial morphology and characteristics of the culture, Gram reaction, catalase, DNase and coagulase for the identification of the isolate, characterizing it as a coagulase-negative and DNase-negative *Staphylococcus*. Aiming

to make a molecular diagnosis, the bacterial DNA was extracted from colonies in culture by phenol/chloroform extraction. Universal primers for the 16S rDNA gene parcial amplification were used (forward: 5'-AGAGTTGATCATGGCTCA-3', reverse: 5'-ACGGCGACTGCTGCTGGCAC-3') (Gatselis, Malli et al. 2006). The amplicon of approximately 480bp was subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel and visualized under ultraviolet light.

The sequencing was performed on ABI PRISM 310 automated equipment (Applied Biosystems) and FASTA sequence was analyzed against sequences deposited in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and the Ribosomal Database Project II (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp). In both banks, sequence analysis showed *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* as species with a high degree of similarity (*E-value*: 0.0, *Max Ident*: 99%; *S_ab score*: 0.894). (GenBank accession number BankIt1435724 Seq1 JF748725).

DISCUSSION

The clinical importance of *S. sciuri* has risen since it has been associated with infections such as endocarditis (Wallet, Stuit et al. 2000), urinary tract infection (Stepanovic, Jezek et al. 2003) and wound infections (Shittu, Lin et al. 2004). Initially described by Kloos and colleagues, it is considered the ancestral species and one of the most abundant in the genus (Kloos, Schleifer et al. 1976). Widely distributed in nature, it is found as a commensal of rodent species, marsupials and it was isolated from pet and farm animals (Hauschild and Schwarz 2003).

The method used to define the resistance profile to antimicrobial was the Disc Diffusion. After 24h of incubation, the inhibition zones were measured and interpreted according to criteria recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). The resistance to cefoxitin categorized it as methicillin-resistant *Staphylococcus*, showing the resistance to beta-lactam antibiotics. Most strains of *S. sciuri* are quite sensitive to this group of antimicrobials (Couto, Wu et al. 2003). However, increasing levels of minimum inhibitory concentration have been found recently (Stepanovic, Dakic et al. 2005). The isolate was resistant to aminoglycosides, quinolones, macrolides and lincosamides tested. The methicillin-resistant *Staphylococcus* is often resistant to other antibiotics. However, resistance to aminoglycosides and macrolides in *S. sciuri* has shown low prevalence in other studies (Stepanovic, Martel et al. 2006; Hauschild, Vukovic et al. 2007). The results obtained by Stepanovic et al, indicate that *S. sciuri* may be naturally resistant to lincosamides.

Only vancomycin and chloramphenicol antibiotics exhibited sensitivity in vitro. Vancomycin remains as the last-choice antibiotic in the fight against serious staphylococcal infections due to its high sensitivity. The occurrence of resistance to chloramphenicol was not detected in our study indicating to be an important therapeutic alternative.

Correct identification of *S. sciuri* is essential for the interpretation of sensitivity testing. Laboratories with few resources use DNase agar as diagnostic test for *S. aureus* rather than the

coagulase test. The DNase test shows positive for species of *S. aureus* and other rare cocci Gram positive, including *S. sciuri*, therefore it should only be used as a screening test. The reading of the inhibition zone for the cefoxitin 30 μ g (DME) disk showed 23mm in diameter in our analysis. The misidentification of the isolate as *S. aureus* could lead to a misinterpretation of the inhibition zone of the cefoxitin disk, classifying it as sensitive to methicillin. This misunderstanding could have important implications, as the probable failure of antimicrobial therapy in the patient, the need for more potent antibiotics and prolonged hospitalization period.

Our observations highlight the importance of evolution and resistance of isolates of *S. sciuri* in clinical infections and the need for appropriate diagnostic protocol for proper identification of this species.

REFERENCES

- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2010.
- Couto, I., S. W. Wu, A. Tomasz and H. de Lencastre (2003). Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the Species. *J Bacteriol* 185(2): 645-653.
- Gatselis, N., E. Malli, G. Papadamou, E. Petinaki and G. N. Dalekos (2006). Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. *J Clin Microbiol* 44(2): 669-672.
- Hauschild, T. and S. Schwarz (2003). Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50(5): 241-246.
- Hauschild, T., D. Vukovic, I. Dakic, P. Jezek, S. Djukic, V. Dimitrijevic, S. Stepanovic and S. Schwarz (2007). Aminoglycoside resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Microb Drug Resist* 13(2): 77-84.
- Kloos, W. E., K. H. Schleifer and R. F. Smith (1976). Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and Its Subspecies. *Int J Syst Bacteriol* 26(1): 22-37.
- Shittu, A., J. Lin, D. Morrison and D. Kolawole (2004). Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus*

- haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *J Med Microbiol* 53(Pt 1): 51-55.
- Stepanovic, S., I. Dakic, D. Morrison, T. Hauschild, P. Jezek, P. Petras, A. Martel, D. Vukovic, A. Shittu and L. A. Devriese (2005). Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J Clin Microbiol* 43(2): 956-958.
- Stepanovic, S., P. Jezek, D. Vukovic, I. Dakic and P. Petras (2003). Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 41(11): 5262-5264.
- Stepanovic, S., A. Martel, I. Dakic, A. Decostere, D. Vukovic, L. Ranin, L. A. Devriese and F. Haesebrouck (2006). Resistance to macrolides, lincosamides, streptogramins, and linezolid among members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Microb Drug Resist* 12(2): 115-120.
- Wallet, F., L. Stuit, E. Boulanger, M. Roussel-Delvallez, P. Dequiedt and R. J. Courcol (2000). Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis* 32(6): 697-698.