

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHRISTIANE JOHNSCHER NIEBEL STIER

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REGIÃO INGUINAL EM RELAÇÃO À REGIÃO
RETAL PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

CURITIBA
2013

CHRISTIANE JOHNSCHER NIEBEL STIER

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REGIÃO INGUINAL EM RELAÇÃO À REGIÃO
RETAL PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Departamento de Enfermagem, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Mestrado Profissional em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Drehmer de Almeida Cruz

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Paganini

CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

CHRISTIANE JOHNSSHER NIEBEL STIER

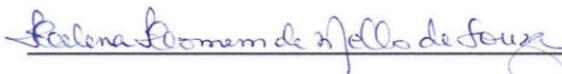
**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REGIÃO INGUINAL EM RELAÇÃO À REGIÃO RETAL PARA
DETECÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Enfermagem – Mestrado Profissional, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Presidente da Banca: Prof^a. Dr^a. Elaine Drehmer de Almeida Cruz

Universidade Federal do Paraná



Membro Titular Externo: Prof^a. Dr^a. Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza
Hospital de Clínicas/UFPR



Membro Titular: Prof^a. Dr^a. Luciana Puchalski Kalinke

Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de Agosto de 2013.

Dedico esse trabalho a Deus por seu infinito amor e generosidade e pela certeza que tenho de estar sempre comigo a me conduzir e abençoar.

Aos meus queridos pais, Fritz e Hedda, que tanto me ensinaram, com seus exemplos maravilhosos e que me permitiram possuir os valores essenciais para ser uma pessoa de bem.

À minha família, meus queridos filhos Lucas, Paola e Marina, por todo o amor e carinho que recebo a cada dia, e ao meu esposo Arnaldo, por seu amor e por estar sempre ao meu lado compartilhando cada momento.

À minha amiga-irmã Regina Scholz, com grande carinho e gratidão, por seus ensinamentos, e que me levaram a trilhar este caminho...e que apesar do tempo e da distância esteve sempre tão próxima...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram, apoiaram e incentivaram na concretização deste estudo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elaine Drehmer de Almeida Cruz, pela orientação, dedicação e disponibilidade. Em sua amizade, compreendeu-me e incentivou-me a seguir meu caminho...

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Paganini, pelas orientações, apoio e amizade. Pela troca de experiências e exemplos que me inspiram no dia-a-dia...

À Banca examinadora, nas pessoas da Prof^a. Dr^a. Luciana Puchalski Kalinke e Dr^a. Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza pelas relevantes contribuições de ajuste e incentivo ao estudo realizado.

Ao Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Paraná, por me receber e permitir que esta etapa se concretizasse...

Ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem – Mestrado Profissional, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Aida Maris Peres, por seu grande empenho e dedicação frente à sua Coordenação.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná agradeço pelos grandes ensinamentos ao longo de todos estes anos...e pela oportunidade desta realização.

Às queridas amigas do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, do Hospital de Clínicas, Karin, Maria Edutânia, Cristina, Célia, Izelândia e Janislei, por tantos e especiais anos de convivência e grande aprendizado e pelo apoio incondicional, sem o qual esta trajetória não teria sido possível...

À querida e especial amiga Karin Lohmann Bragagnolo que um dia me despertou e incentivou para a realização do Mestrado. Sua presença foi constante, fortalecedora e em nenhum momento me faltou com suas palavras e com sua disposição de escuta e aconselhamento.

Às amigas Helena e Líbera pelo contínuo apoio e inestimável contribuição para o êxito deste trabalho, não medindo esforços para me auxiliar em todas as necessidades...

Ao meu filho Lucas que esteve ao meu lado sempre, para me auxiliar a superar minhas limitações na área da informática...não posso imaginar como teria sido sem a sua ajuda...a você devo tanto...e tenho tanta gratidão.

À acadêmica de Enfermagem Gabriela de Souza dos Santos, por ter sido meu “anjo da guarda” e por seu incansável auxílio nos momentos de maior necessidade...

À enfermeira Bruna Morelli, por ter se disposto de maneira tão solícita a me acessar numa das mais importantes etapas deste estudo, a das coletas.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela acolhida e contínua parceria. Agradecimento especial à Bioquímica Maristela Paiva pelo carinho e competência na análise dos materiais coletados e à Adriane Ceschin Maestri, que apesar de todas as dificuldades, permitiu que as análises fôsem realizadas...

Às equipes de enfermagem das unidades em que as coletas foram realizadas, pela receptividade, envolvimento, colaboração e sobretudo pela expectativa positiva em relação aos resultados. Agradeço especialmente aos enfermeiros Viviane, Marli, Andréa, Clélia, Denise, Ivonete, Élide, Rocio, Cristiane, Josandro, Tânia, Tereza, Cristina e Márcio.

Às amigas Sílvia, Regina, Denise e Adriana, pelo companheirismo, troca de experiências e ajuda mútua em cada etapa que juntas trilhamos durante a realização do Mestrado Profissional em Enfermagem da Universidade Federal do Paraná – primeira turma.

Aos familiares e amigos, em especial Eliane, Paulo, Cida, Sônia, Roberto, Luciane, Edison, Marilda, Adilson, Félix, Inês, Heloísa, Miguel, Maria Clara, Luah, Giovanna e Bruno, demonstrando sempre grande carinho e incentivo...

Entre tantas pessoas importantes me permito ainda mencionar a Dr^a. Maria Terezinha Carneiro Leão e o Prof. Dr. Franz Daschner aos quais tenho profunda gratidão, respeito e carinho pois abriram-me as portas e mostraram-me o caminho da plena realização profissional...

E, por fim, aos pacientes que compreenderam a importância deste estudo e se colocaram ao dispor para a realização do mesmo. Muito obrigada!

**Ir em busca do desconhecido necessita
grande coragem e força interior
para trocar o que é conhecido e confortável
pelo que é novo e desconhecido.**

**É por isso que o desconhecido detém
o nosso maior potencial.**

**Ir em busca do nosso potencial desconhecido
às custas de risco
é o caminho da verdadeira grandeza.**

Tal ato trás benefícios e bênçãos não pronunciadas.

Autor desconhecido

RESUMO

O aumento na incidência de bactérias multirresistentes, associado à limitação de opções terapêuticas, é reconhecido como importante problema de saúde pública e imprime adoção de medidas preventivas, entre essas a identificação precoce de pacientes colonizados por meio de culturas de vigilância. A coleta de swabs retais é a técnica mais comumente utilizada para a detecção de bactérias multirresistentes de colonização intestinal. Este estudo teve por objetivo avaliar comparativamente a região inguinal em relação à região retal para detecção de bactérias multirresistentes e como objetivos específicos isolar bactérias multirresistentes do sítio inguinal, determinar a sensibilidade e especificidade do swab inguinal em comparação ao swab retal, e identificar fatores de interferência para a colonização no sítio inguinal por bactérias multirresistentes de colonização intestinal. Trata-se de uma pesquisa exploratória, com abordagem quantitativa, caracterizada como estudo epidemiológico, comparativo, prospectivo e controlado, realizado em hospital público federal, no período de outubro de 2012 a maio de 2013, obedecendo aos preceitos éticos em pesquisa. Esta pesquisa compreendeu a coleta de dois swabs inguinis e um swab retal em 129 participantes hospitalizados e o preenchimento de instrumento de coleta de dados, incluindo fatores de interferência à colonização. Os espécimes clínicos foram analisados fenotipicamente e submetidos a testes genotípicos. Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva, com determinação de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvio padrão para as variáveis quantitativas e por frequências e percentuais para variáveis qualitativas. Para avaliar a qualidade do exame com coleta por meio de swab inguinal em comparação à coleta de swab retal (padrão ouro) foram estimados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia. O sítio inguinal apresentou 91,8% de sensibilidade e 88,7% de especificidade quando comparado ao sítio retal; entre os participantes adultos de unidade de terapia intensiva, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 60%; entre os participantes neonatais os índices foram de 85,7% e 93,3% e entre os participantes do Transplante de Medula Óssea foram de 11,1% e 94,4%, respectivamente. Foram estatisticamente significativos a idade, mobilidade, diarreia, e o uso de sonda vesical de demora e fralda como fatores de interferência, assim como a associação da colonização ao óbito como desfecho. Entre os microrganismos isolados, destacam-se alta sensibilidade e valor preditivo negativo para enterobactérias produtoras de carbapenemases e *Acinetobacter baumannii*. Conclui-se que o sítio inguinal pode ser considerado alternativa segura para a coleta de culturas de vigilância para pesquisa de bactérias multirresistentes de colonização intestinal, à exceção dos pacientes que fazem uso de clorexidina degermante 2%, no banho diário, por sua interferência na microbiota cutânea, como observado neste estudo. Os swabs inguinis representam técnica sensível, específica e de fácil execução na rotina institucional; se combinados os dois sítios de coleta, retal e inguinal, na rotina institucional, a possibilidade de detecção de pacientes colonizados poderá ser otimizada.

Palavras-chave: Bactérias. Resistência microbiana a medicamentos. Vigilância epidemiológica. Portador sadio.

ABSTRACT

The increase in incidence of multidrug-resistant organisms is associated with the limitation of therapeutic options, and recognized as an important public health problem, requiring preventive measures, among them, the early identification of colonized patients by surveillance cultures. The collection of rectal swabs is the most commonly-used technique for detecting bacteria from intestinal colonization. This study aimed to evaluate, comparatively, the inguinal site in relation to the rectal site for the detection of multi-resistant bacteria, and as specific objectives isolate multi-resistant bacteria in the inguinal site, determine the sensitivity and specificity of the inguinal swab in comparison with the rectal swab, and identify interference factors for colonization in the inguinal site by multi-resistant bacteria from intestinal colonization. It is an exploratory research with a quantitative approach, characterized as an epidemiological study. It is comparative, prospective and controlled, performed in a federal public hospital between October 2012 and May 2013, respecting the ethical precepts. It included the collection of two inguinal swabs and one rectal swab among 129 patients and the filling-out of a data collection instrument, including factors which influence the colonization. The clinical specimens were analyzed phenotypically and were submitted to genotypic tests; the results were analyzed through descriptive statistics, with means, medians, minimal values, maximal values, and standard deviation for the quantitative variables and through frequencies and percentages for the qualitative variables. To evaluate the quality of the exam with collection by means of the inguinal swab, in comparison with the examination with the rectal swab (gold standard), there were estimated the values of sensitivity and specificity, the positive predictive value, the negative predictive value, and accuracy. The inguinal site had 91.8% sensitivity and 88.7% specificity when compared to the rectal site; among the adult patients in the intensive care unit, sensitivity was 100% and the specificity was 60%; among neonatal patients, the rates were 85.7% and 93.3%, and among the bone marrow transplant patients, they were 11.1% and 94.4%, respectively. Age, mobility, diarrhea, use of an indwelling urinary catheter and diapers were statistically significant as interference factors, as was the association of colonization with death as an outcome. Among the multidrug-resistant organisms isolated, high sensitivity and negative predictive value stand out for the Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. It is concluded that the inguinal site may be considered a safe alternative for the collection of surveillance cultures for multi-resistant bacteria from intestinal colonization, with the exception of patients using 2% chlorhexidine gluconate in a daily bath/shower, due to its interference with cutaneous microbiota, as observed in this study. The inguinal swabs represent a sensitive, specific technique, easy to use in the institutional routine; if the two sites – rectal and inguinal – are combined, in the institutional routine, the possibility of detecting colonized patients can be optimized.

Keywords: Bacteria. Drug resistance, microbial. Epidemiological Surveillance. Carrier state.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - TRANSMISSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AS BACTÉRIAS. BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PRESENTES NO ORGANISMO DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS.29
- FIGURA 2 – DOMINÂNCIA DAS BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. BACTÉRIAS SENSÍVEIS AOS ANTIBIÓTICOS SÃO ELIMINADAS E AS RESISTENTES TORNAM-SE DOMINANTES.29
- FIGURA 3 – TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS. O GENE QUE DETERMINA A RESISTÊNCIA É CARREADO EM UM TRANSPOSON.29
- FIGURA 4 – TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS. APÊNDICES SEMELHANTES A DEDOS (PILLI) DAS CÉLULAS RESISTENTES ENTRAM EM CONTATO COM AS CÉLULAS SENSÍVEIS AOS ANTIBIÓTICOS, FORMANDO UMA PONTE DE CRUZAMENTO ENTRE AS DUAS CÉLULAS (PILLI BRIDGE).....30
- FIGURA 5 – MOVIMENTAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AS BACTÉRIAS. A CONJUGAÇÃO PERMITE QUE OS PLASMÍDEOS SE MOVIMENTEM DE UMA CÉLULA PARA A OUTRA, TORNANDO AS NOVAS CÉLULAS BACTERIANAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS.....30
- FIGURA 6 – FREQUÊNCIA DE SWABS RETAIS E INGUINAIS POSITIVOS E NEGATIVOS E PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES (N=129)..83
- FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DE SWABS RETAIS E INGUINAIS POSITIVOS E NEGATIVOS (N=102).....85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIAGRAMA PARA O CÁLCULO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	73
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E DESFECHO CLÍNICO DOS PARTICIPANTES COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE SWAB RETAL E SWAB INGUINAL (N=129).....	77
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE SWAB RETAL E SWAB INGUINAL	79
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS COLETAS RETAIS CONCOMITANTES ÀS COLETAS INGUINAIS POR UNIDADE DE INTERNAÇÃO	82
TABELA 5 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL, NA AMOSTRA TOTAL	86
TABELA 6 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL, POR GRUPO DE PACIENTES (N=39).....	86
TABELA 7 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL NA AMOSTRA TOTAL E POR GRUPO DE PACIENTES	87
TABELA 8 - INTERFERÊNCIA DO GÊNERO E DA MOBILIDADE DOS PARTICIPANTES NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DOS RESULTADOS DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102).....	90
TABELA 9 - INTERFERÊNCIA DA INCONTINÊNCIA URINÁRIA E USO DE SONDA VESICAL DE DEMORA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR	

PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102).....	92
TABELA 10 - INTERFERÊNCIA DO USO DE FRALDAS, PRESENÇA DE INCONTINÊNCIA FECAL E DIARRÉIA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102).....	93
TABELA 11 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL CONSIDERANDO AS DIFERENTES BACTÉRIAS ISOLADAS	94
TABELA 12 - FREQUÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM SÍTIO INGUINAL E RETAL.....	95
TABELA 13 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDITIVO NEGATIVO DE SWAB INGUINAL E RETAL PARA DIFERENTES MICRORGANISMOS SEGUNDO ALGUNS PESQUISADORES.....	97

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATM	- Antimicrobianos
BEA	- Agár bile esculina-azida
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRE	- Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos
CTX	- Cefotaxima
DoD	- <i>Department of Defense</i>
ECDC	- <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EPA	- <i>Environmental Protection Agency</i>
ESBL	- Beta-lactamase de Espectro Estendido
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HICPAC	- <i>Healthcare Infection Advisory Committee</i>
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IH	- Infecções Hospitalares
IDSA	- <i>Infectious Diseases Society of America</i>
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LTACH	- <i>Long-Term Acute Care Hospitals</i>
MC	- Ágar MacConkey
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente
NDM	- <i>New Delhi Metallobetalactamase</i>
NIH	- <i>National Institutes of Health</i>
NHSN	- <i>National Healthcare Safety Network</i>
NNISS	- <i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBPs	- Proteínas Ligadoras de Penicilina
SENTRY	- <i>Antimicrobial Surveillance Program Report</i>
SHEA	- <i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i>
SKAPE	- <i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa</i> e as várias espécies de <i>Enterobacter</i>
TSB	- Trypticase Soy Broth
USDA	- <i>Department of Agriculture of United States</i>
UTIs	- Unidades de Terapia Intensiva
VISA	- <i>Staphylococcus aureus</i> com Resistência Intermediária à Vancomicina
VPN	- Valor Preditivo Negativo
VPP	- Valor Preditivo Positivo
VRE	- <i>Enterococcus</i> Resistente à Vancomicina
VRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	24
3.2	EPIDEMIOLOGIA DAS BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL.....	34
3.3	FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES INTESTINAIS	43
3.4	MEDIDAS PARA PREVENÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES INTESTINAIS	46
4	METODOLOGIA	62
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	62
4.2	LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA	62
4.3	PARTICIPANTES DA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS	63
4.4	CÁLCULO DA AMOSTRA.....	64
4.5	COLETA DE DADOS	64
4.5.1	Coleta de material.....	64
4.5.1.1	Primeira etapa	64
4.5.1.2	Segunda etapa	65
4.5.2	Processamento laboratorial	67
4.5.2.3	Identificação fenotípica	67
4.5.2.4	Testes fenotípicos de resistência.....	69

4.5.2.5 Testes genotípicos de resistência	70
4.6 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	76
5.1.1 Caracterização demográfica e desfecho clínico	76
5.1.2 Caracterização clínica dos pacientes e unidades de internação	78
5.2 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS	82
5.3 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS E FATORES DE INTERFERÊNCIA PARA A COLONIZAÇÃO	90
5.4 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS POR MICRORGANISMO	93
6 CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICES	120
ANEXOS	132

1 INTRODUÇÃO

A introdução de drogas antimicrobianas na prática clínica representou um dos grandes avanços na Medicina para o tratamento de doenças infecciosas. Com a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, e sua disponibilidade para uso clínico a partir de 1940, deu-se início à era dos antibióticos, sendo esse considerado um dos acontecimentos mais marcantes do século XX (PEREIRA; PITA, 2005). Com a introdução da terapia antimicrobiana há 80 anos, a prática médica, até então focada no diagnóstico, passou a ser focada no tratamento, salvando milhões de vidas nos anos que se seguiram (PAPHITOU, 2013). O que parecia ser a solução definitiva para o tratamento de todas as infecções bacterianas, teve como consequência de seu uso indiscriminado, o surgimento nos Estados Unidos, já na década de 50, das primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina (SHAFFER; GOLDIN, 1974).

Com o surgimento de bactérias resistentes à penicilina, foram produzidos outros antibióticos de espectro estendido, e seu uso irracional resultou no aparecimento de bactérias multirresistentes (SHAFFER; GOLDIN, 1974). O uso excessivo de antibióticos no ambiente hospitalar teve como consequência direta a pressão seletiva sobre os microrganismos, e por sua vez o aumento na resistência bacteriana (ISTURIZ; CARBON, 2000). Deste modo, muitos dos avanços terapêuticos que foram alcançados, graças à disponibilidade de antibióticos, encontram-se ameaçados. O aumento da resistência bacteriana à maioria dos antibióticos disponíveis, devido ao seu uso indiscriminado, teve como resultado imenso impacto social e financeiro (PAPHITOU, 2013).

A resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão expostas (LIVERMORE, 1995). Para os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), órgão estadunidense que norteia diretrizes mundiais para a prevenção e controle de infecções hospitalares (IH), microrganismos multirresistentes são predominantemente bactérias resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos e, normalmente, resistentes a todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis, à exceção de um ou dois deles (CDC, 2006). Uma

segunda definição conceitua multirresistência quando o microrganismo é resistente a mais do que duas das cinco seguintes classes de antimicrobianos: cefalosporinas (ceftazidima ou cefepime), carbapenêmicos (imipenem ou meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino ou levofloxacino), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina ou ampicacina) e ampicilina-sulbactam (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Alguns microrganismos podem ser classificados como pan-resistentes quando apresentam resistência comprovada *in vitro* a todos os antimicrobianos testados em exame microbiológico (BRASIL, 2010).

São considerados microrganismos multirresistentes *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) ou resistente à vancomicina (VRSA), além de bacilos gram-negativos, como enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) ou de carbapenemase (KPC), incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. e ainda *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (CDC, 2006). Tais microrganismos, compõem as seguintes classes de bactérias: as bactérias gram-positivas, os bacilos gram-negativos da família das enterobactérias e os bacilos gram-negativos não fermentadores (CASELLAS, 2011).

Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de beta-lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, presente nas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2004) inativando o antimicrobiano, impedindo-o de apresentar atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (LIVERMORE, 1995). Contudo, o surgimento e a disseminação de inúmeros microrganismos multirresistentes decorrem de vários fatores, tais como mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas, nas quais os genes de resistência são transferidos para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e a disseminação de microrganismos multirresistentes; proliferação e disseminação de clones multirresistentes (TENOVER, 2006).

O número de infecções causadas por esses agentes tem crescido significativamente nos últimos anos. Tal fato contribui para o aumento no tempo de

hospitalização, nos custos assistenciais e na mortalidade, decorrentes da redução das opções terapêuticas antimicrobianas (CDC, 2006). Essas infecções estão, frequentemente, associadas ao aumento de taxas de morbimortalidade pela indisponibilidade de drogas efetivas ao tratamento (CDC, 2006; BRASIL, 2013c). Assim sendo, sua prevenção e controle são considerados pelos CDC uma prioridade mundial que requer responsabilidade tanto das instituições de saúde quanto das agências reguladoras (CDC, 2006).

A resistência antimicrobiana é, reconhecidamente, uma das maiores ameaças atuais para a humanidade. Está entre os maiores desafios gerados pela escalada de aceleração da atividade humana, que atinge proporções globais, tais como: a escassez de energia, água e alimentos; mudanças climáticas; aumento da acidez das águas dos oceanos, além da emergência de doenças (WALKER *et al.*, 2009). Dados apontam que apenas MRSA tem causado mais óbitos nos Estados Unidos do que os casos de enfisema, HIV/AIDS, doença de Parkinson e homicídios combinados, chegando a aproximadamente 19.000 óbitos/ano (KLEVENS *et al.*, 2007). Aproximadamente dois milhões de cidadãos norte-americanos são acometidos por infecções hospitalares a cada ano, resultando em 99.000 óbitos, a maioria causada por microrganismos multirresistentes (KLEVENS *et al.*, 2007). Sepsis e pneumonia estão associadas a 50.000 óbitos, tendo representado, somente em 2006, um gasto equivalente a 8 bilhões de dólares ao sistema de saúde norte-americano (EBER *et al.*, 2010).

O aumento acelerado da resistência bacteriana tem levado especialistas da área da saúde, nos Estados Unidos, a solicitar que o governo encare esta crescente ameaça como ainda mais séria que o bioterrorismo (BEHTA; ROSS; CHAUDHRY, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a emergência de microrganismos multirresistentes como um importante problema de saúde pública mundial. Em 2011, o dia 7 de abril, Dia Mundial da Saúde, elegeu a “Multirresistência Bacteriana” como tema, comparando a criticidade da atualidade, no que concerne ao tratamento de pacientes com patógenos multirresistentes, à era pré-antibiótica (LEUNG *et al.*, 2011).

Como parte deste esforço global, já em 1999, os CDC, o *Food and Drug Administration* (FDA), o *National Institutes of Health* (NIH), a *Environmental Protection Agency* (EPA), o *Department of Defense* (DoD), o *Department of Agriculture of United States* (USDA) e outras importantes instituições norte-

americanas vinculadas à área da saúde reuniram-se para constituir uma força tarefa denominada *The Interagency Task Force on Antimicrobial Resistance*, que tem por objetivo coordenar as atividades das agências federais vinculadas à resistência antimicrobiana, em reconhecimento à crescente importância da resistência antimicrobiana como ameaça à saúde pública (CDC *et al.*, 2012).

Um importante plano de ação foi desenvolvido por esta força tarefa, intitulado “*A Public Health Action Plan to Combat Antimicrobial Resistance*”, cuja primeira versão foi publicada em 2001, e então, revisado e disponibilizado para consulta pública, em março de 2011. Neste plano, foram dispostos 11 objetivos-chave para combater a resistência antimicrobiana nas seguintes áreas: de vigilância, prevenção e controle, e pesquisa e desenvolvimento de produtos. Este plano propõe que pacientes, profissionais da área de saúde, hospitais e legisladores devam dar continuidade a um trabalho conjunto, envolvendo os vários segmentos da sociedade, com o objetivo de empregar estratégias efetivas que proporcionem uma melhor utilização dos antimicrobianos (CDC *et al.*, 2012).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America – IDSA*) publicou, em 2004, um importante documento intitulado *Bad Bugs, No Drugs: as Antibiotic Stagnates, a Public Health Crisis Brews*, no qual faz uma alerta assustador a respeito da crescente emergência de microrganismos multi e pan-resistentes e, o paralelo declínio na descoberta de novos antimicrobianos para tratar infecções causadas por estes microrganismos. Neste manifesto, a IDSA chama atenção para o fato de que os antibióticos, até hoje, salvaram milhões de vidas e que, apesar de terem sido denominados *drogas milagrosas*, nem sempre são efetivos, uma vez que as bactérias podem tornar-se resistentes ao longo do tempo a estas drogas, dificultando ou impedindo o tratamento de infecções. E, ainda, que sem uma política pública de inovação e suporte financeiro, serão disponibilizados cada vez menos novos antibióticos para tratar o número crescente de infecções causadas por microrganismos multiresistentes, o que vem assustando tanto a sociedade norteamericana quanto a comunidade global (BOUCHER *et al.*, 2009; PAPHITOU, 2013).

No documento da IDSA são mencionados os patógenos com elevada resistência antimicrobiana e que atualmente são os responsáveis pela maioria das IH nos Estados Unidos. Em 2008 foram denominados de patógenos “SKAPE”, uma vez que efetivamente “escapam” da ação dos antimicrobianos. Compõem este grupo

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e as várias espécies de *Enterobacter* (RICE, 2008). O aumento da incidência de microrganismos multirresistentes, em especial os gram-negativos, e a falta de opções terapêuticas a curto e médio prazo para tratamento das infecções, colocam os pacientes sob grande risco, e reforçam a importância de medidas preventivas para conter a sua disseminação (BOUCHER *et al.*, 2009).

A vigilância ativa, deste modo, é considerada um importante componente dos programas de controle de multirresistentes, uma vez que permite a detecção precoce de microrganismos emergentes, a monitoração das tendências epidemiológicas e a verificação da eficácia das intervenções empregadas. Várias estratégias têm sido utilizadas para a detecção de colonização assintomática, entre elas a coleta de material para culturas de vigilância, considerada a abordagem mais sensível para identificação de pacientes colonizados (MORGAN *et al.*, 2010).

Culturas de vigilância, de acordo com Harris e colaboradores (2004), são definidas como o *screening* periódico de pacientes sob risco de aquisição de bactérias multirresistentes, resultando no isolamento de pacientes colonizados. Constituem-se numa técnica de controle de infecção, na medida em que possibilitam identificar pacientes colonizados por microrganismos multirresistentes e reduzir infecções causadas por estes patógenos (OSTROWSKY *et al.*, 2001; BEN-DAVID *et al.*, 2010). Culturas de vigilância permitem a identificação precoce de pacientes assintomáticos e a adoção de precauções de contato, limitando a disseminação de microrganismos multirresistentes (COHEN *et al.*, 2011). As culturas de vigilância também possibilitam o controle concomitante de vários microrganismos multirresistentes, na medida em que a colonização de um mesmo paciente por mais de um patógeno multirresistente tem sido descrita (HARRIS *et al.*, 2004).

Conceitua-se colonização como a proliferação de microrganismos em superfícies cutâneas ou mucosas sem resposta imunológica detectável do hospedeiro, sem danos celulares ou manifestação clínica. Sua presença no hospedeiro pode ocorrer por períodos variados, tornando-o fonte potencial de transmissão. Por outro lado, infecção é a introdução de microrganismos no hospedeiro após vencerem os mecanismos de defesa, resultando na proliferação e invasão de tecidos com conseqüente manifestação de sintomatologia clínica (SIEGEL *et al.*, 2007). Para Carvalho e Marques (1999) a colonização é definida

pela presença de microrganismos em determinados sítios anatômicos sem que haja manifestação clínica de doenças, representando fonte importante de transmissão cruzada, enquanto infecção é definida como uma situação em que a presença de microrganismos passa a culminar em manifestações clínicas de doença.

Nos hospitais brasileiros adota-se a coleta de culturas de vigilância para detecção de bactérias multirresistentes de colonização intestinal através de swabs retais. Em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, as culturas de vigilância fazem parte da rotina e têm por objetivo obter informações microbiológicas relativas aos pacientes individualmente, assim como o perfil epidemiológico da unidade como um todo (HAASE *et al.* 2013).

A técnica de coleta de culturas de vigilância para identificação de pacientes colonizados por enterobactérias multirresistentes, realizada por meio de swabs retais, consiste na introdução de swab bacteriológico na ampola retal, para a coleta de material da mucosa retal, a partir de dois movimentos giratórios de 360° (BRASIL, 2004; HARRIS *et al.*, 2004). Esta prática tem se tornado bastante comum nas Instituições de Saúde; no entanto, em nossa prática assistencial gera grande desconforto e constrangimento, tanto para os pacientes submetidos à coleta, quanto para os profissionais de enfermagem que a realizam. Ressalta-se que muitos pacientes são submetidos a coletas semanais e por longos períodos. Temos observado, por vezes, recusa de pacientes para que a coleta de swab retal seja realizada, principalmente em se tratando de pacientes adolescentes.

As coletas de culturas de vigilância são realizadas na admissão hospitalar de pacientes transferidos de outras instituições de saúde, ou na transferência interna, quando provenientes de áreas críticas em que a incidência de germes multirresistentes é elevada, e, ainda, semanalmente, em áreas críticas (CLANCY *et al.*, 2006; BRASIL, 2010). De acordo com os CDCs (2012a), a coleta de culturas de vigilância tem sido uma das medidas adotadas para o controle de vários microrganismos multirresistentes. Esta proposta se baseia na premissa de que apenas uma minoria de pacientes será identificada como sendo portadora de patógenos multirresistentes, através da coleta apenas de amostras clínicas de pacientes infectados (MONTECALVO *et al.*, 1995). Desta forma, um grupo expressivo de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes não será identificado, assim como não serão instituídas medidas de precauções de contato (BEN-DAVID *et al.*, 2010; COHEN *et al.*, 2011). Nesta condição, estes pacientes são considerados

reservatórios e fonte importante de transmissão cruzada de patógenos multirresistentes, a exemplo das enterobactérias produtoras de ESBL e resistentes a carbapenêmicos (CALFEE; JENKINS, 2008; BUEHLMANN *et al.*, 2010).

Estudos de Weinstein e colaboradores (1996) e Lautenbach e colaboradores (2005) demonstraram que a coleta de swab peri-retal, quando comparada à coleta retal, resultou em maior aceitabilidade da parte dos pacientes. Buscando uma alternativa ao swab retal, a proposta deste estudo foi comparar os resultados obtidos por meio desta técnica de coleta com os resultados obtidos por meio da coleta de swab inguinal. A região perineal é densamente colonizada com a microbiota intestinal, condição facilitada pelo calor e umidade desta região, o que promove o crescimento bacteriano (WEINTROB *et al.*, 2010). Os resultados deste estudo poderão subsidiar mudanças de topografia para a coleta de swab de vigilância para pesquisa de bactérias multirresistentes, reduzindo a exposição do paciente e o constrangimento, e contribuindo para a humanização da assistência hospitalar.

Deste modo, temos como hipótese desta pesquisa de que o sítio anatômico da região inguinal apresenta a mesma sensibilidade e especificidade que a região retal para a detecção de bactérias multirresistentes nas culturas de vigilância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente a região inguinal em relação à região retal para detecção de bactérias multirresistentes

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias multirresistentes em coletas de swabs inguinais
- Determinar a sensibilidade e a especificidade do swab inguinal em comparação ao swab retal para detecção de bactérias multirresistentes
- Identificar fatores de interferência para a colonização do sítio inguinal por bactérias multirresistentes de colonização intestinal

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Em 1928 o médico oficial inglês Alexander Fleming fez uma descoberta casual que revolucionaria a medicina: o primeiro antibiótico da história da humanidade – a penicilina. Sua descoberta é considerada um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da Medicina e da Farmácia do século XX. Para muitos cientistas, a Medicina passou, de fato, a ser considerada uma verdadeira ciência após a descoberta dos antibióticos. Até então, somente a interpretação religiosa poderia auxiliar na cura das doenças infecciosas. Costuma-se dividir a história da Medicina e da Farmácia, e também a história das doenças humanas em períodos: antes e depois da penicilina – o primeiro antibiótico (PEREIRA; PITA, 2005; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; HISTÓRIA de Alexander Fleming, 2009).

Ao retornar da Primeira Guerra Mundial, e ter se deparado com o intenso sofrimento dos soldados em decorrência de ferimentos infectados, Fleming passou a estudar, exaustivamente, a bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável por abscessos em feridas por armas de fogo. Percebeu que placas contendo colônias dessas bactérias tiveram seu crescimento inibido pela presença de um fungo do gênero *Penicillium*, que cresceu nas adjacências daquelas colônias, levando à descoberta de que um microrganismo poderia produzir substâncias inibitórias do crescimento de outros microrganismos. Mais tarde, este fungo ficou caracterizado como *Penicillium notatum*, o único entre setenta espécies deste gênero capaz de produzir a substância penicilina, o que reforça a casualidade desta descoberta ímpar (PEREIRA; PITA, 2005; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; HISTÓRIA de Alexander Fleming, 2009).

A penicilina foi, porém, de fato isolada em 1938, por Ernst Boris Chain e Howard Walter Florey, cientistas da Universidade de Oxford, que deram continuidade às pesquisas com a penicilina, estudando sua composição química e ação terapêutica. À época, a penicilina foi testada frente a 80 diferentes bactérias, tendo

sido demonstrada sua eficácia na inativação de microrganismos. Em 1940 foi disponibilizada pela primeira vez, para tratamento clínico, tendo salvo a vida de inúmeros combatentes feridos durante a Segunda Guerra Mundial (HISTÓRIA de Alexander Fleming, 2009). Em 1945, Alexander Fleming dividiu o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia com Ernst Boris Chain e Howard Walter Florey por seus papéis na descoberta e desenvolvimento da penicilina (PEREIRA; PITA, 2005; WOODWARD; SHURKIN; GORDON, 2009).

Nas duas décadas seguintes novas classes de antimicrobianos foram descobertas: as sulfonamidas em 1935, e a estreptomicina em 1944, da classe dos aminoglicosídeos, sintetizada a partir da bactéria *Streptomyces griseus*, encontrada no solo. Outros antibióticos que se seguiram tiveram a mesma origem: o cloranfenicol, a tetraciclina, os macrolídeos e os glicopeptídeos. Em 1960 a indústria farmacêutica conseguiu, pela primeira vez, produzir um antimicrobiano sintético, no caso, a meticilina e, em 1962, uma quinolona - o ácido nalidíxico. Esta foi considerada a “era de ouro” da terapia antimicrobiana (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

Ao mesmo tempo, tinha início a “era da resistência bacteriana”. Já no final da década de 1940, surgiram as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, a partir da produção de uma enzima denominada penicilinase, capaz de hidrolisar as penicilinas, tendo sido a primeira enzima beta-lactamase a ser reconhecida. Sequencialmente a meticilina foi desenvolvida com a finalidade de tratar infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Com o objetivo de alcançar melhorias nas classes de antimicrobianos e aumentar o espectro de ação e atividade antimicrobiana, foram produzidas outras drogas, como a ampicilina que, além de ser efetiva contra bactérias gram-positivas, também o é contra as enterobactérias (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Entretanto, já no início da década de 1960, foi descrita uma nova beta-lactamase capaz de hidrolisar a ampicilina, denominada de beta-lactamase TEM-1 e, logo depois, foi identificada a enzima TEM-2 (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965).

Também na década de 1960, surgiram as cefalosporinas, antibióticos que, assim como a penicilina, pertencem à classe dos beta-lactâmicos por possuírem em comum um anel beta-lactâmico, e que passaram a ter ampla utilização. As cefalosporinas estão entre os agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana, mais precisamente na fase final da biossíntese da substância que compõe a parede celular, chamada de peptidoglicano, presente nas bactérias gram-

positivas e gram-negativas. Os primeiros estudos sobre as cefalosporinas datam de 1948, quando o fungo *Cephalosporium acremonium* foi isolado próximo a uma saída de esgoto, na costa da Sardenha (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2013b). As cefalosporinas foram classificadas em quatro gerações, baseando-se na cronologia da introdução dos antimicrobianos no mercado e em sua atividade antibacteriana. A cefazolina é um exemplo de cefalosporina de primeira geração, drogas que inicialmente eram efetivas contra bactérias gram-positivas, além de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. A seguir, surgiram as cefalosporinas de segunda geração que apresentavam espectro de ação estendido contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, incluindo, além dos citados acima, as demais *Enterobacteriaceae*; a cefotaxima é um exemplo de cefalosporina de segunda geração. As cefalosporinas de terceira geração apresentavam maior eficácia contra microrganismos gram-negativos, sendo algumas drogas desta geração efetivas contra *Pseudomonas aeruginosa*; são exemplos a ceftazidima e a ceftriaxona. E, mais recentemente, foram disponibilizadas as cefalosporinas de quarta geração, com espectro de ação aumentado quando comparado às de terceira geração, como por exemplo, a droga cefepima. As cefalosporinas atualmente disponíveis são compostos semi-sintéticos derivados de um dos três antibióticos isolados do caldo do fungo que deu origem a este grupo de antimicrobianos, a cefalosporina C (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2013b).

Outros antibióticos beta-lactâmicos foram acrescentados, no decorrer, ao arsenal terapêutico, como os carbapenêmicos e os monobactâmicos. Os carbapenêmicos são uma classe que inclui o imipenem, o meropenem e o ertapenem, conhecidos por sua efetividade tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, e também contra anaeróbios. Essas drogas penetram com facilidade pelos canais porínicos nas bactérias gram-negativas e atuam por meio de sua ligação com proteínas fixadoras de penicilina (PBPs), presentes na parede bacteriana, causando a lise osmótica da bactéria. Os carbapenêmicos são mais resistentes à hidrólise causada pelas betalactamases, tanto cromossômicas quanto plasmidiais, quando comparados a outros antibióticos beta-lactâmicos (RANG; DALE; RITTER, 2012). Essas drogas também tiveram sua origem na natureza, produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. Foram descobertas em 1976, mas somente em 1979 foram disponibilizadas para uso clínico, passando a ser

sintetizadas em laboratório. Inicialmente, entre os carbapenêmicos, foi comercializado o imipenem, associado à cilastatina, com a finalidade de bloquear a ação de uma enzima renal, a dipeptidase, que provoca a hidrólise e inativação do antimicrobiano. Em 1987, foi introduzido no mercado o meropenem, cujo espectro de ação é semelhante ao do imipenem, porém com maior estabilidade à ação da dipeptidase renal e que, devido à sua estrutura química, dispensa o inibidor enzimático cilastatina em sua formulação (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2013a).

Percebe-se, portanto, que a indústria farmacêutica tem buscado o aprimoramento contínuo nas formulações antimicrobianas visando, sobretudo, o acréscimo ao espectro e à atividade antimicrobiana. Entretanto, a busca por fármacos mais seguros, que induzam menos efeitos colaterais e proporcionem melhora na absorção das drogas orais, na concentração sanguínea e na distribuição tecidual, são aspectos essenciais que devem ser observados (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

Destaca-se que um grande avanço na atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas ocorreu em 1980, com a síntese do norfloxacino, a primeira quinolona fluorada para uso clínico humano. As quinolonas representam um ótimo exemplo de drogas com farmacodinâmica aperfeiçoada e segura. O ácido nalidíxico, sintetizado em 1962 e classificado como quinolona de primeira geração, tinha seu uso limitado às infecções do trato urinário, uma vez que alcançava baixas concentrações sanguíneas, má distribuição tecidual e rápida metabolização. O norfloxacino oferece metabolismo estável e boa distribuição tecidual, com amplo espectro de ação contra gram-negativos, com destaque para a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo seu uso limitado ao trato urinário e intestinal. As quinolonas de terceira geração tiveram sua atuação ampliada para tratamentos sistêmicos; são exemplos o ciprofloxacino e o levofloxacino, conhecidos por fluorquinolonas. Com o advento das quinolonas de quarta geração, ampliou-se o espectro de ação também para estreptococos hemolíticos, pneumococos e bactérias anaeróbias (ANVISA, 2013a).

Apesar dos contínuos esforços da indústria farmacêutica em busca de novos antimicrobianos, poucos foram os avanços, nas últimas décadas, em relação à disponibilização de novas classes de agentes antimicrobianos (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). O FDA (*Food and Drug Administration*), instituição norte-americana

responsável pela aprovação e liberação de medicamentos para uso terapêutico em seres humanos, diminuiu, gradativamente, a liberação da comercialização de novos antimicrobianos em razão da quase total inexistência de novas drogas a serem testadas. No período de 1980 a 2007 este cenário se apresentou da seguinte maneira, considerando a proporção de tempo a cada cinco anos e o número de novos antimicrobianos aprovados pelo FDA: 1980-1984: 17 novos ATMs; 1985-1989: 12 novos ATMs; 1990-1994: 10 novos ATMs; 1995-1999: 12 novos ATMs; 2000-2004: 8 novos ATMs; e 2005-2007: 2 novos ATM (BOUCHER *et al.*, 2009). A descoberta de novos antimicrobianos esteve sempre acompanhada do rápido surgimento de cepas resistentes aos mesmos. Como exemplo, temos a emergência de novas classes de beta-lactamases causando resistência a cada novo antibiótico beta-lactâmico lançado para compor o arsenal terapêutico (MEDEIROS, 1997).

As bactérias podem apresentar um dos seguintes fenótipos frente aos novos antibióticos: suscetibilidade, resistência intrínseca ou resistência adquirida aos antimicrobianos. A suscetibilidade resulta da ausência total de mecanismos de resistência, possibilitando a sobrevivência das bactérias na presença de determinados compostos. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os exemplares de uma determinada espécie, a exemplo do gênero *Enterobacter*, naturalmente resistente à cefoxitina, devido à produção de uma beta-lactamase (HARBOTTLE *et al.*, 2006).

A resistência aos antibióticos, por sua vez, pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos, conhecida por resistência adquirida, a qual tem importância epidemiológica. A aquisição de genes de resistência ocorre, na maioria das vezes, através de elementos móveis, tais como plasmídeos, transposons ou integrons. Os genes que codificam beta-lactamases são exemplo de genes disseminados por plasmídeos, que podem ser facilmente adquiridos por diversas bactérias (HARBOTTLE *et al.*, 2006). A sequência de figuras abaixo ilustra o mecanismo de aquisição de resistência dos microrganismos (FIGURAS 1, 2, 3, 4 e 5).

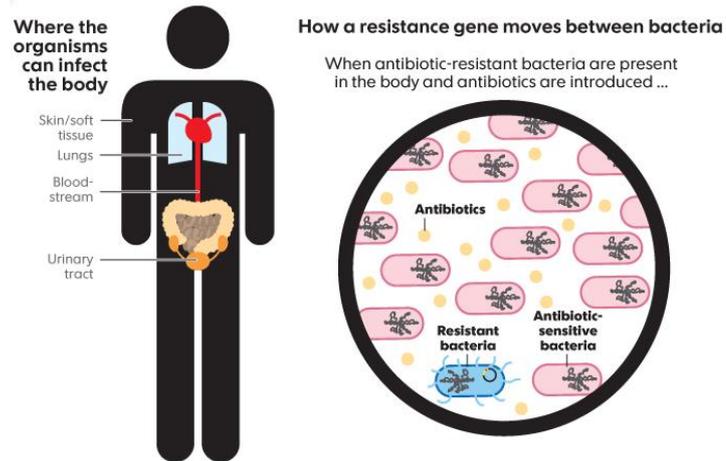


FIGURA 1 - TRANSMISSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AS BACTÉRIAS. BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS PRESENTES NO ORGANISMO DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS.

FONTE: Website Usa Today. University of Virgínia Health System, 2013.

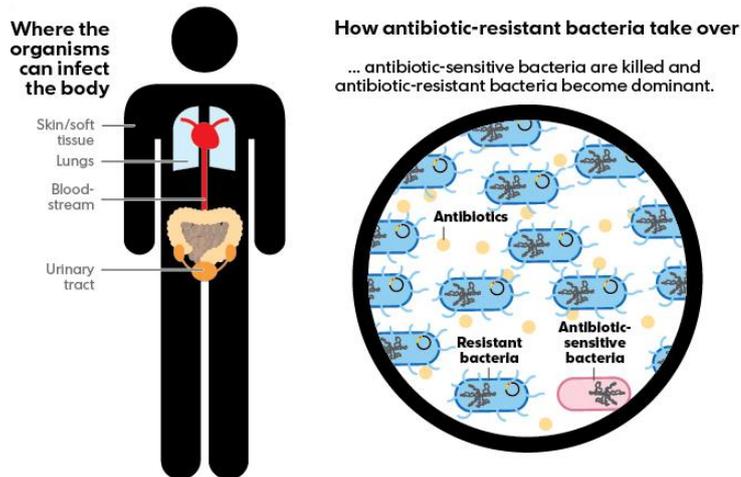


FIGURA 2 – DOMINÂNCIA DAS BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. BACTÉRIAS SENSÍVEIS AOS ANTIBIÓTICOS SÃO ELIMINADAS E AS RESISTENTES TORNAM-SE DOMINANTES.

FONTE: Website Usa Today. University of Virgínia Health System, 2013.

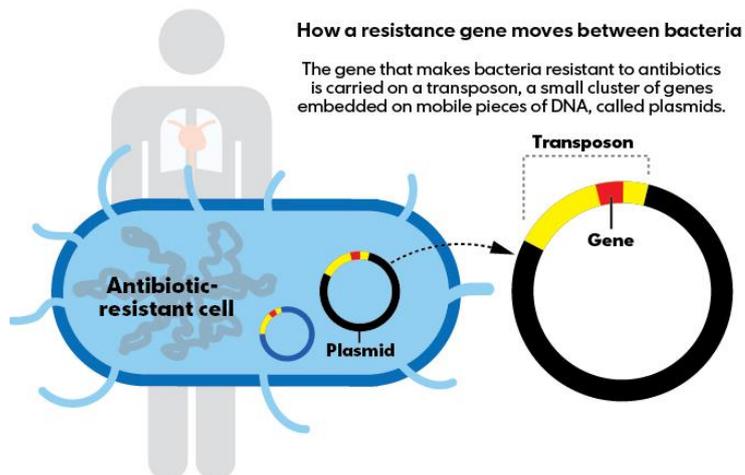


FIGURA 3 – TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS. O GENE QUE DETERMINA A RESISTÊNCIA É CARREADO EM UM TRANSPONON.

FONTE: Website Usa Today. University of Virgínia Health System, 2013.

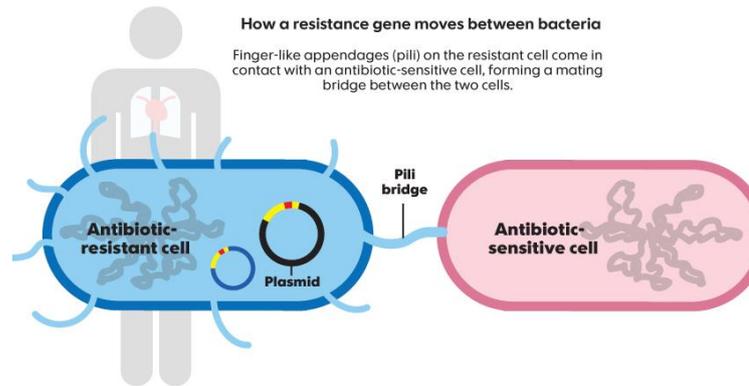


FIGURA 4 – TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS. APÊNDICES SEMELHANTES A DEDOS (PILLI) DAS CÉLULAS RESISTENTES ENTRAM EM CONTATO COM AS CÉLULAS SENSÍVEIS AOS ANTIBIÓTICOS, FORMANDO UMA PONTE DE CRUZAMENTO ENTRE AS DUAS CÉLULAS (PILLI BRIDGE).

FONTE: Website Usa Today. University of Virgínia Health System, 2013.

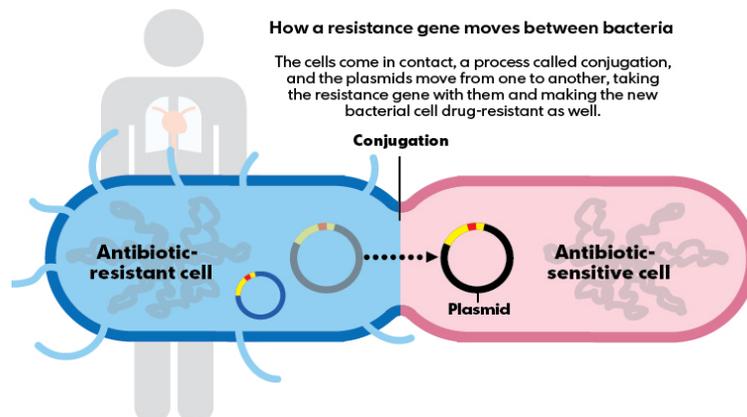


FIGURA 5 – TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA ENTRE AS BACTÉRIAS. A CONJUGAÇÃO PERMITE QUE OS PLASMÍDEOS SE MOVIMENTEM DE UMA CÉLULA PARA A OUTRA, TORNANDO AS NOVAS CÉLULAS BACTERIANAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS.

FONTE: Website Usa Today. University of Virgínia Health System, 2013.

As bactérias possuem excepcional habilidade para aquisição de resistência, através de vários mecanismos já conhecidos. Neste contexto, o trato intestinal atua como um local de transferência de genes de resistência aos antibióticos, no qual ocorrem trocas destes genes, não apenas entre as bactérias que compõem a microbiota intestinal, mas também entre estas bactérias e outras que transitam, ocasionalmente, pelo intestino, mas por tempo suficiente para que possam adquirir e transmitir estes genes de resistência (SALYERS; GUPTA; WANG, 2004). A forma mais simples e rápida de aquisição de resistência bacteriana tem sido através da incorporação de genes de resistência préformados por outras bactérias. Contudo,

novos mecanismos recentemente descobertos tornam ainda mais crítico o atual cenário, pois apresentam maior implicação na emergência, disseminação e manutenção da resistência bacteriana (LIVERMORE, 2003; SALYERS; MOON; SCHLESINGER, 2007).

Estes novos mecanismos de resistência compreendem bombas de efluxo, hipermutabilidade, integrons e adição plasmidial. Alguns mecanismos de resistência estão sendo disseminados através dos vários continentes e outros são restritos a um determinado local ou país; observa-se maior prevalência destes mecanismos em países emergentes que se tornaram recentemente prósperos e em serviços nos quais a utilização de antimicrobianos tem sido muito frequente (LIVERMORE, 2003).

Entre os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, estão a alteração de permeabilidade da membrana celular bacteriana, a alteração do sítio de ação, as bombas de efluxo e os mecanismos enzimáticos. A alteração da permeabilidade da membrana celular externa das bactérias gram-negativas, que é composta por polissacarídeos, ocorre pela presença de proteínas especiais denominadas *porinas*, que formam canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade reduzida é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina e pela resistência de *Pseudomonas aeruginosa* ao trimetoprim (ANVISA, 2013b).

A alteração do sítio de ação no qual determinado antimicrobiano deveria atuar, impedindo a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto, resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos, como ocorre com eritromicina e clindamicina (ANVISA, 2013b).

Bombas de efluxo constituem um mecanismo de resistência por meio do bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular (ANVISA, 2013b), e demonstram potente habilidade de retirar os antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos do citoplasma plasmático, com consequente diminuição de sua concentração (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010).

O mecanismo de resistência bacteriana mais importante e frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas. A produção das enzimas beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos. A primeira beta-lactamase foi identificada num isolado de *Escherichia coli*, antes ainda da utilização generalizada da penicilina na prática clínica (ABRAHAM, CHAIN; 1940). As enzimas beta-lactamases foram classificadas por Ambler em 1980, que se baseou em suas sequências de aminoácidos, sendo agrupadas em quatro classes moleculares denominadas de A, B, C e D. As beta-lactamases que pertencem às classes A, B e C são chamadas de serinas beta-lactamases e as da classe D, de metalo-beta-lactamases (AMBLER, 1980).

As beta-lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antibióticos beta-lactâmicos se ligam às denominadas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), através do qual exercem seu efeito antibacteriano, impedindo a síntese da parede celular bacteriana. Algumas beta-lactamases utilizam íons de zinco para romper o anel beta-lactâmico, como no caso das metalo-beta-lactamases, mas a maioria atua através do mecanismo ester-serina em que a enzima associa-se ao antibiótico, causando sua hidrólise e inativação (LIVERMORE, 1995). As enzimas beta-lactamases são codificadas por genes localizados em cromossomos ou sítios extracromossômicos como plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou serem induzidas. Os plasmídeos que transportam genes codificadores de beta-lactamases podem ser transferidos para diferentes cepas ou espécies, facilitando a disseminação da resistência. A resistência quase universal de *Staphylococcus aureus* à penicilina é mediada por uma beta-lactamase induzível, codificada por genes plasmídeos (BUSH, JACOBY 2010).

Os primeiros inibidores naturais de beta-lactamases foram isolados de espécies de *Streptomyces* em 1972, porém não apresentavam eficácia antibacteriana. Em 1976 foi descoberto o ácido clavulânico, extraído de culturas de *Streptomyces clavuligerus*. Logo após surgiram o sulbactam e o tazobactam, considerados inibidores “suicidas” das beta-lactamases, uma vez que são destruídos logo após sua interação com a enzima. Três inibidores de uso clínico foram associados a beta-lactâmicos: ácido clavulânico associado à amoxicilina, o sulbactam associado à ampicilina e o tazobactam associado à piperacilina (BUSH, JACOBY 2010).

Nas bactérias gram-negativas, o papel das beta-lactamases na resistência bacteriana é complexo e extenso. Verifica-se a presença de quantidades abundantes de enzimas; muitas delas inativam vários antimicrobianos beta-lactâmicos, estando os genes que codificam essas beta-lactamases sujeitos a mutações que expandem a atividade enzimática e que são transferidos de modo relativamente fácil. Além disso, as beta-lactamases de bactérias gram-negativas são secretadas no espaço periplasmático, onde atuam em conjunto com a barreira de permeabilidade da parede celular externa, produzindo resistência clinicamente significativa a antimicrobianos.

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), mediadas por plasmídeos, foram descritas pela primeira vez na Alemanha, em 1983, e inativam as cefalosporinas de terceira e quarta geração e os monobactâmicos, como ocorre em cepas de *Klebsiella pneumoniae*. São assim denominadas porque ampliam o espectro de hidrólise das penicilinas e promovem a hidrólise dos antimicrobianos betalactâmicos. As beta-lactamases mediadas por cromossomos são produzidas em baixos níveis por *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e outros bacilos gram-negativos; quando esses microrganismos são expostos a antimicrobianos beta-lactâmicos são induzidos altos níveis de beta-lactamases, produzindo resistência às cefalosporinas de terceira geração, cefamicinas e combinações de beta-lactâmicos/ácido clavulânico ou sulbactam. A evolução ocorrida entre estas enzimas é resultado do uso excessivo de antimicrobianos e de sua pressão sobre o ambiente. A destruição enzimática do anel beta-lactâmico por enzimas beta-lactamases também constitui o principal mecanismo de resistência às cefalosporinas, além do desenvolvimento de PBPs com menor afinidade pelo antimicrobiano e diferenças estruturais nas PBPs, que são alvo dessas drogas PATERSON; BONOMO, 2005).

A evolução ocorrida entre estas enzimas é resultado do uso excessivo de antimicrobianos e de sua pressão sobre o ambiente (PATERSON, 2005). O uso de antimicrobianos exerce pressão seletiva sobre as bactérias e potencializa a ocorrência da resistência. Por outro lado, a disseminação de bactérias com resistência antimicrobiana adquirida também é fruto de falhas nas medidas de prevenção (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A atual emergência de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, ilustra o seu potencial de

resposta rápida às mudanças na pressão seletiva ambiental, resultante do uso indiscriminado destes antimicrobianos. O mecanismo de degradação enzimático através das beta-lactamases, é o seu principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

As enterobactérias adquiriram importantes mecanismos de resistência, através da produção de enzimas carbapenemases, universalmente denominadas pelas siglas KPC, OXA, IMP, VIM e NDM-1, e que se disseminam através de plasmídeos entre as várias espécies (BRATU, 2007). As enzimas carbapenemases são divididas em duas famílias: a das serina-beta-lactamases, como a KPC, e das metalo-beta-lactamases, como a NDM-1, VIM e IMP. Estes mecanismos de resistência são responsáveis por falhas terapêuticas dos antibióticos carbapenêmicos frente às enterobactérias (BRASIL, 2013b). As KPCs pertencem à classe A de Ambler e foram encontradas primeiramente no microrganismo *Klebsiella pneumoniae* (YIGIT *et al.*, 2001) e, posteriormente em outros gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (QUEENAN, A. M. ; BUSH, K., 2007 ; CHAI *et al.*, 2008).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DAS BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL

Patógenos resistentes a antimicrobianos constituem-se num importante e crescente problema de Saúde Pública mundial, especialmente pelas limitadas opções terapêuticas e alta mortalidade associada. Mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados comumente (MUTO *et al.*, 2003). O Brasil e demais países da América Latina apresentam altos níveis de resistência bacteriana em comparação à Europa e Estados Unidos, especialmente entre bacilos gram-negativos não-fermentadores e enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (GALES *et al.*, 2008; CASELLAS, 2011). A prevalência de bactérias multirresistentes apresenta variação de acordo com o decorrer do tempo, espaço geográfico e cenário das instituições de saúde. Um exemplo clássico refere-se ao surgimento de VRE na região leste dos EUA em meados da década de 1990, não sendo encontrado no

oeste daquele país por vários anos, variando sua prevalência de acordo com cada estado (SIEGEL *et al.*, 2007).

Durante as últimas décadas, a prevalência de microrganismos multirresistentes nos hospitais norte-americanos cresceu gradativamente. Desde que o primeiro MRSA foi isolado nos Estados Unidos, em 1968, sua incidência em pacientes hospitalizados cresceu de 20% a 25% na década de 1990 (SIEGEL *et al.*, 2007). Em 1999 a prevalência de MRSA era superior a 50% dos *Staphylococcus aureus* isolados em pacientes de unidades de terapia intensiva; em 2003 esta prevalência cresceu para 59,5% nos hospitais norte-americanos. A incidência de MRSA nos hospitais brasileiros tem oscilado entre 30 e 60% (ROSSI, 2011), e os isolados estão relacionados na sua grande maioria ao clone brasileiro BEC-MRSA, um dos cinco maiores clones de circulação no mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O primeiro caso de infecção por VRE em seres humanos foi detectado em meados dos anos 1980 na Europa, inicialmente na Inglaterra e França (LECLERQ *et al.*, 1988) e logo a seguir, em 1987, nos EUA (SAHM *et al.*, 1989; MARTONE, 1998); desde então, este microrganismo multirresistente é isolado em todo o mundo. Acredita-se que as primeiras cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina tenham surgido em decorrência do uso de avoparcina em ração usada em granjas, sendo transportadas da Europa para os Estados Unidos, e selecionadas no ambiente hospitalar (RICE, 2006). Nos Estados Unidos os *Enterococcus* são mais prevalentes em comparação ao Brasil e América Latina, onde são apontados como oitava ou nona causa de infecção hospitalar (ROSSI, 2011).

A prevalência de enterococos isolados em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva norte-americanas aumentou de 25% em 1999 para 28,5% em 2003, sendo que até 1990 este número era inferior a 1% (BOYCE, *et al.*, 1994). *The Surveillance Network*, uma rede de vigilância epidemiológica norte-americana, analisando os resultados de hemoculturas, no ano de 2002 em 268 hospitais daquele país, encontrou que 67% dos isolados de enterococos eram resistentes à vancomicina. O aumento na incidência de VRE, nos EUA, está diretamente ligado ao consumo aumentado de vancomicina devido à incidência crescente de casos de MRSA e de *Clostridium difficile* (SADER; MOET; JONES, 2009). Os custos de internação de um paciente que adquire VRE aumentam em média 50% em relação a pacientes não colonizados (SIEGEL *et al.*, 2007).

No Brasil, o primeiro caso de VRE ocorreu 16 anos após o primeiro relato nos Estados Unidos, em amostra de hemocultura de uma paciente portadora de anemia aplástica, na cidade de Curitiba, Estado do Paraná. A cepa isolada foi *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, fenótipo VanD4 e, desde então, este microrganismo passou a representar um problema emergente em nosso país, porém com outro fenótipo, o VanA (DALLA COSTA *et al.*, 1998). Os dados latino-americanos revelam que houve aumento na incidência de VRE entre 2003 e 2008, de 5% para 15,5%. A mudança mais significativa, porém, ocorreu no Brasil, com taxas de VRE variando de 7% para 31% no mesmo período, tornando-se endêmico em várias instituições (SADER; MOET; JONES, 2009). Um estudo realizado em um hospital na cidade de São Paulo, com 87 pacientes investigados por meio de culturas fecais, em 45,7% obteve-se resultado positivo para VRE e, destes, 54,1% eram *Enterococcus faecium* e 45,9% eram *Enterococcus faecalis* (D'AZEVEDO *et al.*, 2008).

Dentre os bacilos gram-negativos multirresistentes de relevância clínica encontram-se, principalmente, as enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemase (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, para os quais há cada vez menos opções terapêuticas (KUNZ; BROOK, 2010). *Enterobacteriaceae* ou enterobactérias representam uma família de bactérias gram-negativas. Compõem este grupo de microrganismos bactérias de grande importância epidemiológica, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii*, entre outros. A capacidade das *Enterobacteriaceae* em se tornarem resistentes a antibióticos de amplo espectro, como as cefalosporinas, é um problema bem conhecido (JACOBY; MUNHOZ-PRICE, 2005). As enterobactérias ESBL têm se disseminado e se tornado cada vez mais prevalentes no mundo, desde que foram identificadas na Europa, em 1983 (KNOTE *et al.*, 1983), e depois nos Estados Unidos, em 1989 (QUINN *et al.*, 1989). Os antibióticos carbapenêmicos tornaram-se uma importante alternativa de tratamento para estes patógenos, e sua utilização passou a ser intensa. Como consequência, surgiram as novas enzimas beta-lactamases capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e, assim, as *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos, que através de elementos

genéticos móveis, passaram também a ser um problema global (GUPTA *et al.*, 2011; YIGIT *et al.*, 2001).

Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos foi descrita pela primeira vez, em 2001, na Carolina do Norte (YIGIT *et al.*, 2001), e desde então vários surtos de infecção por esta bactéria foram relatados (BRATU *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2008), sendo que o primeiro ocorreu em 2009 na região metropolitana de Detroit e acometeu três hospitais (MARCHAIM *et al.*, 2011). Em 2003, de todos os isolados em pacientes hospitalizados, nos EUA, 20,6% eram resistentes a uma ou mais das seguintes classes de antibióticos: fluorquinolonas, carbapenêmicos ou aminoglicosídeos. O programa americano de monitoramento global de sensibilidade ao meropenem denominado *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program*, registrou um aumento significativo na resistência ao meropenem entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, nos Estados Unidos, que passou de 0,6% em 2004 para 5,6% em 2008 (GUPTA *et al.*, 2011). Este programa também observou que as carbapenemases se disseminaram para outras espécies de *Enterobacteriaceae* (RHOMBERG; JONES, 2009). Em 2012, os CDCs informaram a ocorrência de pelo menos um caso de infecção hospitalar por *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos, em aproximadamente 4% dos hospitais norte-americanos, sendo a taxa de mortalidade para pacientes com infecção de corrente sanguínea com este patógeno superior a 50% (CDC, 2013). As *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase também têm emergido em outros países, caracterizando sua disseminação intercontinental (BEN-DAVID *et al.*, 2010; POULOU *et al.*, 2012), tendo se tornado endêmica em países como Estados Unidos, Israel, Grécia e Itália (AGODI *et al.*, 2011; SCHWABER, 2011; CIOBOTARO *et al.*, 2011).

A velocidade com que os novos mecanismos de resistência são disseminados pelo mundo, a partir de sua identificação, é exemplificada pela nova carbapenemase *New Delhi Metallobetalactamase* (NDM), que transcende as fronteiras geográficas, reafirmando que a resistência microbiana é, de fato, um grave problema de saúde pública mundial (JOHNSON; WOODFORD, 2013). Os primeiros registros de aquisição deste mecanismo de resistência entre as enterobactérias foram feitos em 2008, na Índia e Paquistão, embora análises posteriores mostrassem que já havia a presença desta enzima em material genético de enterobactérias desde 2006. Atualmente, estas enterobactérias encontram-se

disseminadas nos hospitais e também na comunidade destes países, tendo sido identificadas, inclusive, em água tratada (NORDMANN *et al.*, 2011). Em 2010 foram encontradas também no Canadá, Estados Unidos e Reino Unido e, mais recentemente, em vários países da América do Sul, entre os quais, Uruguai, Colômbia e Paraguai, havendo registro atualmente de sua presença em mais de 40 países nos vários continentes (JOHNSON; WOODFOR, 2013; BRASIL, 2013b). Os primeiros casos de enterobactérias produtoras de NDM-1 no Brasil ocorreram entre setembro de 2012 e abril de 2013, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (BRASIL, 2013b). Em razão de sua rápida disseminação internacional e de sua capacidade de transmissão a vários patógenos gram-negativos, a NDM deverá tornar-se a carbapenemase de maior prevalência no mundo (PATEL; BONOMO, 2013).

Um outro aspecto relevante com relação às enterobactérias multirresistentes tem sido sua presença cada vez mais acentuada na comunidade. As enterobactérias produtoras de ESBL, que inicialmente eram restritas ao ambiente hospitalar, têm sido frequentemente reportadas em casos detectados na comunidade (CANTÓN *et al.*, 2008). Em alguns países, como a Índia, a concentração de cepas produtoras de ESBL na comunidade é bastante elevada e tem sido enfatizada pela comunidade internacional, particularmente a partir dos achados ambientais de cepas produtoras de carbapenemase NDM-1 (HAWSER *et al.*, 2010).

A rápida disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL na comunidade gerou o uso excessivo de carbapenêmicos e a consequente produção destes novos mecanismos de resistência (HAWSER *et al.*, 2010). Um estudo publicado recentemente ilustra muito bem este cenário, pois evidenciou a colonização intestinal por enterobactérias multirresistentes em neonatos que não possuíam pressão antimicrobiana direta. Foram selecionados 75 neonatos, que preenchiam os critérios de parto vaginal, saudáveis e aleitamento materno exclusivo, a fim de evitar aquisição de resistência pela água ou alimentos. Neonatos que apresentavam mal-formações congênitas, hospitalização, prematuridade, fatores predisponentes para sepse, uso materno ou pelo neonato de antibióticos foram excluídos. Foram coletadas amostras de fezes nos dias 1 (mecônio), 21 e 60, e pesquisadas enterobactérias produtoras de ESBL ou carbapenemase. Os resultados encontrados neste estudo realizado na Índia, mostraram que 65,3% dos neonatos

estavam colonizados por enterobactérias no dia 1, refletindo a aquisição da microbiota materna e, conseqüentemente, as cepas multirresistentes. Enterobactérias ESBL foram isoladas em 19,9% das amostras, e um dos neonatos apresentou *Enterobacter* sp produtor de KPC. Estes resultados mostram fortes evidências de que, mesmo na ausência de qualquer pressão de antibióticos, existe uma enorme carga de resistência a antibióticos beta-lactâmicos (KOTHARI *et al.*, 2013).

Acinetobacter baumannii, bacilo gram-negativo não fermentador de glicose, começou a ganhar importância nos últimos 30 anos desde que, no início da década de 1980, vários surtos de infecção passaram a ser descritos em países europeus, principalmente na Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda (FOURNIER; RICHET, 2006). Uma das principais razões da crescente preocupação com este microrganismo se deve ao aparecimento de cepas multirresistentes e pan-resistentes, responsáveis por surtos de infecções hospitalares. Foram publicados inúmeros estudos, com relatos de infecção e colonização relacionados a *Acinetobacter baumannii*, principalmente em unidades de terapia intensiva e de queimados, onde estão concentrados os pacientes de maior gravidade e dependência de cuidados assistenciais (JOLY-GUILLOU, 2005; TOWNER, 2009; ARVANITI *et al.*, 2012). É considerado o patógeno mais frequentemente associado às infecções hospitalares, devido à sua capacidade em adquirir genes de resistência de forma bastante rápida (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Atualmente, cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos tornaram-se um grande problema no continente europeu, em especial na Itália, Grécia, Espanha, Inglaterra e Turquia (DIMOEDI, A. P., 2005; PELEG; SEIFET; PATERSON, 2008). Situação equivalente ocorreu nos Estados Unidos, onde os primeiros surtos por essas bactérias resistentes a carbapenêmicos passaram a ocorrer a partir de 1991, após uso intensivo de imipenem para tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (GO *et al.*, 1994). Dados do *National Nosocomial Infection Surveillance Systems* (NNISS), obtidos de vários hospitais norte-americanos entre 1986 e 2003, revelaram aumento significativo de cepas de *Acinetobacter* resistentes a imipenem de 0% para 20% ($p < 0.001$), bem como um aumento no número de casos de pneumonia por *Acinetobacter baumannii* neste mesmo período, de 4% para 7% ($p < 0.001$).

(GAYNES; EDWARDS, 2005). Dados posteriores publicados pelo *National Healthcare Safety Network* (NHSN) dos CDC, relativos ao período de 2006-2007, apontam que essa bactéria permanece como importante patógeno implicado em pneumonias associadas à ventilação mecânica, com taxa de 8,4%, sendo o terceiro microrganismo mais prevalente após *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (HIDRON *et al.*, 2008). Atualmente, nos Estados Unidos, as cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes representam em torno de 74% dos isolados de *Acinetobacter baumannii*, de acordo com os dados notificados anualmente pelos hospitais norte-americanos ao NHSN (KALLEN; SRINIVASAN, 2010).

Os países da América Latina possuem uma das mais elevadas taxas de prevalência de *Acinetobacter baumannii* pan-resistentes do mundo (UNAL; GARCIA-RODRIGUEZ, 2005; ANDRADE, *et al.*, 2008). No Brasil essa bactéria emergiu como importante patógeno hospitalar, estando associada a vários surtos desde o início da década de 1990 (LEVIN *et al.*, 1996). *Acinetobacter baumannii* é responsável por surtos de infecção hospitalar de difícil controle; frequentemente a colonização precede a infecção. Normalmente, quando infecções por esses agentes ocorrem, significa que existe um número elevado de pacientes colonizados e, neste caso, surtos são quase inevitáveis (EHRILCH *et al.*, 2003). Infecções hospitalares causadas por *Acinetobacter baumannii* acometem, na maioria das vezes, pacientes muito debilitados, de unidades de terapia intensiva, com taxas de mortalidade que variam de 26% a 68% (SUNENSHINE *et al.*, 2007). Existem grandes dificuldades de erradicação dessas bactérias do ambiente hospitalar, sendo seu poder de dessecação uma das causas apontadas que lhe permite sobrevivência por longos períodos e persistência em superfícies de materiais e equipamentos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Um outro aspecto relevante que diz respeito a *Acinetobacter baumannii* é o impacto econômico que representam as infecções causadas por este patógeno. Em estudo realizado na Universidade de Pittsburgh, Estados Unidos, foi estimado que o custo relativo para cada paciente colonizado por *Acinetobacter baumannii*, internado em unidade de terapia intensiva, é de aproximadamente \$44,000 dólares, considerando que metade dos pacientes colonizados evoluirão com quadro de infecção, com conseqüente aumento no tempo de hospitalização e na mortalidade. Este cálculo foi baseado no tempo médio aumentado de hospitalização, que em

caso de infecção, gira em torno de $25,23 \pm 10,59$ dias, associado ao custo do leito/dia, que é de \$4,397.50. Foi feita, paralelamente, uma projeção de custo nacional, considerando-se os dados do *National Healthcare Safety Network* no período de 2006-2007, com 902 casos de infecção por *Acinetobacter baumannii* reportados. O custo estimado oscilou entre \$7.4 milhões e \$26.1 milhões de dólares (LEE *et al.*, 2010), cujo recurso poderia ser utilizado para a prevenção desses agravos à saúde. *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* integram a lista dos seis famosos patógenos denominados de SKAPE, considerados uma das maiores ameaças emergentes deste século (BOUCHER *et al.*, 2009; EISLER, P., 2012).

Pseudomonas aeruginosa, também um bacilo gram-negativo não fermentador, é considerado um dos principais patógenos responsáveis por infecções hospitalares. Os dados publicados tanto pelo NNISS como pelo *International Nosocomial Infection Control Consortium* apontam-no como o patógeno mais frequentemente isolado nas infecções do trato respiratório e nas infecções primárias de corrente sanguínea associadas a cateteres venosos centrais em UTIs (ROSENTHAL *et al.*, 2010). A resistência a quinolonas entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes de unidade de terapia intensiva aumentou de 23% para 29,5%, do ano de 1999 para 2003 (CDC, 2006). Em estudo realizado na Colômbia, observou-se que essa bactéria tem se consolidado como um germe multirresistente, uma vez que a frequência com que se apresenta como resistente está em aumento progressivo (BRICEÑO *et al.*, 2010). Estudo de prevalência realizado entre 2007 e 2009, em oito hospitais terciários na Tailândia, encontrou 261 culturas clínicas das quais se isolou *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando que aproximadamente 71,6% das amostras eram resistentes a carbapenêmicos. Em todos os hospitais avaliados, a resistência ao meropenem foi superior a 50% (KHUNTAYAPORN *et al.*, 2012).

Na América Latina, dados do Programa SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), entre 1997 e 2000, identificaram-na como o principal responsável pelas pneumonias hospitalares, com altas taxas de resistência à maioria dos antibióticos testados (GALES; SADER; JONES, 2002). No Brasil, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* representaram o quarto e quinto patógenos associados a infecções de corrente sanguínea, conforme dados do estudo de vigilância brasileiro SCOPE, realizado em 16 hospitais das cinco regiões do país, no período de 2007 a

2010 (MARRA *et al.*, 2011). Altas taxas de resistência a carbapenêmicos já haviam sido apontadas para os dois patógenos, com tendência crescente, em estudo realizado em hospital de alta complexidade, localizado no sul do Brasil, entre janeiro de 2004 a dezembro de 2008, mostrando que *Acinetobacter baumannii* apresentava 77,3% de resistência ao imipenem e 80% ao meropenem, em 2008, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* apresentou 45,1% de resistência ao imipenem e 12,8% ao meropenem (BAUMGART; MOLINARI; SILVEIRA, 2010).

O aumento na longevidade da população mundial trouxe como consequência o aumento na prevalência de doenças crônicas as mais diversas, com necessidade cada vez mais frequente de hospitalizações, decorrentes de inúmeras complicações. Neste cenário, surgem nos vários países as chamadas *nursing homes* ou casas de apoio, que acolhem pessoas idosas e com grande fragilidade, e que muitas vezes necessitam de cuidados assistenciais, em unidades de emergência e terapia intensiva. Assim, as *nursing homes* tornaram-se reservatórios importantes de microrganismos multirresistentes, e motivo de grande preocupação devido ao risco de transmissão cruzada destes patógenos entre os hospitais e estas instituições. Vários estudos de prevalência de microrganismos multirresistentes têm sido conduzidos para avaliar estas populações (ROONEY *et al.*, 2009). Um estudo de prevalência realizado na Bélgica, em 2011, com 2791 residentes nessas instituições, encontrou uma taxa de 6,2% para enterobactérias produtoras de ESBL, e nenhum caso de VRE (JANS *et al.*, 2013). Situação bem diversa foi observada em países como Irlanda e Itália, que reportaram taxas de 41% e 64%, respectivamente. Por outro lado, na Suécia e França as taxas foram próximas às da Bélgica, em torno de 3% (ANDERSSON *et al.*, 2012; BERTRAND *et al.*, 2012).

A prevalência de bactérias gram-negativas multirresistentes em *nursing homes* nos Estados Unidos é semelhante à da Itália e Irlanda, com taxa de 51%, em estudo realizado em instituição localizada em Boston (POP-VICAS *et al.*, 2008). Estudo multicêntrico realizado em 13 hospitais da cidade de Michigan, observou que aproximadamente 10% dos pacientes colonizados por microrganismos gram-negativos multirresistentes tiveram exposição recente a *nursing homes*. Houve forte associação entre esta exposição e enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em 31,6% dos casos ($p < 0,001$) e *Acinetobacter baumannii* em 14,9% dos casos ($p < 0,001$) (MARCHAIM *et al.*, 2012).

3.3 FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES INTESTINAIS

O trato intestinal representa importante reservatório para microrganismos multirresistentes, especialmente para bacilos gram-negativos, como enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, mas também para bactérias gram-positivas, como *Enterococcus* (DONSKEY, 2004). Apesar da maioria dos pacientes colonizados por estes patógenos permanecerem assintomáticos, infecções podem ocorrer por translocação intestinal ou por contaminação fecal de feridas ou dispositivos invasivos (DONSKEY, 2004).

Pacientes vulneráveis à colonização e infecção por microrganismos multirresistentes incluem aqueles com doença grave, especialmente os imunocomprometidos; submetidos a cirurgias; ou com dispositivos invasivos e, dentre estes, incluem-se, principalmente, aqueles internados em unidades de terapia intensiva de hospitais terciários. O risco de um paciente adquirir VRE nessas unidades aumenta, significativamente, quando a proporção de pacientes colonizados por essas bactérias excede os 50%, e o número de dias de exposição a um paciente com VRE exceder os 15 dias (PUSNIAK *et al.*, 2002). Fatores de risco que incluem comorbidade, pressão de colonização, tempo sob risco e exposição a antibióticos são comuns para microrganismos multirresistentes, tais como VRE, enterobactérias produtoras de ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* e MRSA (BONTEN *et al.*, 1998). O uso de antibióticos é fator de risco comum, na medida em que promove o desequilíbrio da microbiota intestinal, tornando pacientes vulneráveis à colonização por bactérias multirresistentes, e com risco aumentado de evoluir com infecção (HARRIS *et al.*, 2004).

Pacientes colonizados por bactérias multirresistentes podem permanecer portadores por longos períodos e servir como importante fonte de disseminação no ambiente hospitalar (BUEHLMANN *et al.*, 2010). Não existem protocolos de descolonização estabelecidos para as bactérias multirresistentes, à exceção de MRSA (BUEHLMANN *et al.*, 2008). Alguns ensaios clínicos estão sendo realizados na tentativa de erradicação de portadores intestinais de enterobactérias produtoras de ESBL (HUTTNER *et al.*, 2013). Num estudo randomizado, duplo-cego e placebo-

controlado, foi testada a eficácia de um regime de descolonização oral em pacientes adultos que possuíam swab retal positivo para enterobactérias produtoras de ESBL. Cinquenta e quatro pacientes foram selecionados, dos quais metade compôs o grupo placebo e a outra metade recebeu sulfato de colistina e sulfato de neomicina quatro vezes ao dia, por 10 dias, além de nitrofurantoína por cinco dias, quando o paciente apresentava bacteriúria causada por estes patógenos. O resultado mostrou que houve redução de colonização, com significância estatística entre os dois grupos durante o tratamento, mantendo-se até um dia após o término: 9/26 *versus* 19/22 no sexto dia de tratamento ($p < 0.001$) e 8/25 *versus* 20/26 no dia primeiro após tratamento ($p = 0,001$). No dia sétimo após tratamento, o efeito havia desaparecido: 18/27 *versus* 17/25 ($p = 0,92$), ficando evidente a falha deste protocolo (HUTTNER *et al.*, 2013).

Entre os vários ensaios que objetivaram encontrar um regime efetivo de descolonização para enterobactérias produtoras de ESBL, alguns estudos também se propuseram a estabelecer um protocolo de prevenção de colonização para bactérias multirresistentes. Pesquisa conduzida numa UTI-Neonatal, num hospital da Áustria, que se propôs a avaliar o efeito da colistina oral profilática na prevenção de colonização por enterobactérias produtoras de ESBL em neonatos, concluiu que, além da colistina não ter prevenido a colonização por bactérias produtoras de ESBL, houve indução de resistência à colistina, mostrando sua ineficiência (STRENGER *et al.*, 2011).

A pressão seletiva decorrente da utilização de determinados antimicrobianos no ambiente hospitalar exerce um papel preponderante na colonização de pacientes por bactérias multirresistentes, possibilitando o aumento de sua prevalência e que venham a causar infecção. Neste sentido, a pressão de colonização também tem sido considerada como importante fator de risco para que novos pacientes sejam colonizados por microrganismos multirresistentes. Tal pressão ocorre tanto por influência do ambiente hospitalar, quanto pela influência externa, quando pacientes previamente colonizados são admitidos de outras instituições ou até mesmo provenientes da comunidade (HARRIS *et al.*, 2004). A influência da comunidade no ambiente hospitalar passa a ser relevante, na medida em que se começa a observar um decréscimo na proporção de microbiota sensível presente na comunidade, o que diminuirá a possibilidade de redução na incidência de bactérias multirresistentes nas instituições de saúde (LIPSITCH; SAMORE, 2002).

Os fatores de risco para aquisição de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, descritos na literatura, incluem o uso prévio de antibióticos como carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, tempo de permanência em unidade de terapia intensiva, ventilação mecânica, gravidade da doença de base, contato com pacientes colonizados ou infectados por esse agente, ou história de colonização prévia (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006; PLAYFORD; CRAIG; IREDELL, 2007). Para estes pesquisadores, a prevalência de pacientes colonizados na unidade de terapia intensiva e a densidade de colonização, isto é, o número de sítios colonizados, representaram fator de risco para colonização. A pressão de colonização está fortemente correlacionada à aquisição de *Acinetobacter baumannii* multirresistente em unidades de terapia intensiva. Arvaniti e colaboradores (2012) também observaram que tanto a pressão de colonização elevada quanto a presença de mais de dois pacientes colonizados durante uma mesma semana, representaram risco aumentado de aquisição deste patógeno em UTI. Sugerem que práticas de vigilância e medidas de controle sejam adotadas imediatamente após a detecção dos dois primeiros casos de colonização por estes patógenos, a fim de evitar sua disseminação ou manifestação de infecção. Além disto, os pacientes mais vulneráveis para aquisição de *Acinetobacter baumannii* foram aqueles sob antibioticoterapia prolongada e em ventilação mecânica por longo período. O tempo de hospitalização, anterior à admissão em UTI é um importante preditor de colonização por *Acinetobacter baumannii*. Para cada dia prévio de hospitalização o risco de colonização por *Acinetobacter baumannii* à admissão em UTI aumenta em 8% ($p=0,034$) (ARVANITI *et al.*, 2012).

Para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*, uso prévio de antibióticos, tempo de permanência em UTI, dias de hospitalização e ventilação mecânica, representam fatores de risco (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006). E, os fatores de risco identificados para colonização ou infecção por gram-negativos não fermentadores produtores de metalo-beta-lactamase (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) incluem o uso prévio de antibióticos betalactâmicos e quinolonas, e hospitalização prolongada, como preditores independentes (ZHANG *et al.*, 2009).

O uso prévio de antibióticos é também, reconhecidamente, o principal fator de risco para aquisição de enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido, a partir do desequilíbrio da microbiota anaeróbia intestinal, com

diminuição do mecanismo de defesa contra patógenos multirresistentes (DONSKEY, 2006). Outros fatores de risco também associados à colonização ou infecção por enterobactérias produtoras de ESBL incluem viagens, contato com o sistema de saúde e doenças crônicas (GUILLET *et al.*, 2010). A disseminação de cepas de enterobactérias produtoras de ESBL na comunidade, a partir de pacientes que receberam alta hospitalar colonizados por estes patógenos e que apresentam colonização do trato gastrointestinal prolongada, tem sido um dos fatores de risco para o aumento da transmissão cruzada fora do ambiente hospitalar (ZAHAR *et al.*, 2010).

Para aquisição de Enterobactérias produtoras de carbapenemase, os fatores de risco descritos são a hospitalização prolongada, permanência em unidade de terapia intensiva, presença de dispositivos invasivos, como ventilação mecânica, imunossupressão, e uso prévio de antibióticos, incluindo os carbapenêmicos (NORDMANN; CRUZON; NAAS, 2009; GUPTA *et al.*, 2011). Pacientes com diabetes também são considerados de alto risco para aquisição de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, devido à imunossupressão e maior manuseio pela equipe assistencial (CHITNIS *et al.*, 2012). Entretanto, não só pacientes imunocomprometidos ou gravemente enfermos estão expostos ao risco de colonização ou infecção por essas bactérias: pacientes de menor criticidade também podem se tornar colonizados ou evoluir com infecção em decorrência de falhas nas práticas de controle de infecção, ficando expostos a risco de desfechos desfavoráveis, e a maiores taxas de mortalidade (BORER *et al.*, 2009). A pressão de colonização também esteve diretamente relacionada com o risco de aquisição de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos no ambiente hospitalar (SCHWABER, *et al.*, 2011).

3.4 MEDIDAS PARA PREVENÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES INTESTINAIS

De acordo com os CDCs, uma vez que o microrganismo multirresistente é introduzido numa instituição de saúde ou unidade de internação, a transmissão e a persistência da cepa resistente são determinadas pela vulnerabilidade dos

pacientes, pela pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos utilizados, pelo potencial de transmissão aumentado em decorrência do número elevado de pacientes colonizados ou infectados (pressão de colonização), e pelo impacto na implementação e aderência de medidas preventivas (CDC, 2006). Frente a esta conjuntura, os programas de controle de infecção hospitalar têm priorizado a identificação precoce de pacientes “colonizados/ infectados” por bactérias multirresistentes de acordo com recomendações dos CDCs e também da Agência Nacional de Vigilância Sanitária tendo por base, a Nota Técnica nº 1/2010, de 25 de outubro de 2010, que prevê medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes (BRASIL, 2010).

Os CDCs recomendam a implementação de protocolos de culturas de vigilância para pesquisa de microrganismos multirresistentes, em pacientes considerados como população de risco, como aqueles de Unidades de Terapia Intensiva, Queimados, Transplante de Medula Óssea e Oncológicos; pacientes transferidos de unidades ou serviços sabidamente com alta prevalência de microrganismos multirresistentes; pacientes em contato direto com pacientes colonizados ou infectados, e pacientes previamente infectados ou colonizados. Para detecção de bactérias multirresistentes de colonização intestinal tem sido orientada a coleta de swabs retais, peri-retais ou, ainda, a coleta de fezes, como as amostras mais indicadas para a realização de culturas de vigilância (SIEGEL *et al.*, 2007; NORDMANN *et al.*, 2012).

Considerando que o trato gastrointestinal é o principal reservatório de Enterobactérias e de bacilos gram-negativos, por conseguinte também será o principal reservatório de cepas multirresistentes destas bactérias (DONSKEY, 2004). Deste modo, a cultura de uma amostra de fezes é considerada o padrão-ouro para a identificação de colonização do trato gastrointestinal por bacilos gram-negativos multirresistentes. Entretanto sua realização como rotina de identificação de pacientes colonizados nos programas de controle de infecção é considerada impraticável devido às dificuldades técnicas em se isolar patógenos multirresistentes a partir de uma concentração tão elevada de bactérias. Assim sendo, a proposta que passou a ser aceita, universalmente, para a identificação de pacientes colonizados por patógenos multirresistentes em trato gastrointestinal, tem sido a realização de culturas de swabs retais ou peri-retais (MUTO *et al.*, 2003).

A efetividade da realização de culturas de vigilância e da adoção de precauções de contato no controle da disseminação de microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar depende de vários fatores, incluindo a forma de propagação bacteriana (transmissão pessoa a pessoa *versus* pressão seletiva pelo uso de antibióticos); o número de pacientes que não são submetidos a precauções de contato, por terem apenas coletas de culturas clínicas; o tempo de duração da colonização e a prevalência de colonização nas populações de risco (SIEGEL *et al.*, 2007, WEINTROB *et al.*, 2010).

A sensibilidade e a especificidade dos swabs retais e peri-retais para a detecção de bacilos gram-negativos multirresistentes, em comparação às amostras de fezes como padrão-ouro, foram determinadas por Lautenbach e colaboradores (2005), tendo como foco a detecção de colonização do trato gastrointestinal por *Escherichia coli* resistente à fluoroquinolona. A sensibilidade do swab peri-retal comparado à amostra de fezes foi de 90%, com intervalo de confiança de 95%, e a especificidade foi de 100%. Para o swab retal, a sensibilidade foi também de 90% e a especificidade de 100%. Estes resultados demonstraram que tanto o swab retal como o peri-retal apresentaram excelente sensibilidade e especificidade para a detecção de colonização gastrointestinal pela bactéria pesquisada. Resultados de swabs retais e peri-retais falso-negativos foram encontrados quando a concentração deste patógeno nas fezes era muito baixa, isto é, menor do que cinco colônias por placa.

Dois estudos anteriores haviam avaliado a sensibilidade e a especificidade dos swabs retais e peri-retais para a detecção de VRE, utilizando a cultura de fezes como padrão-ouro. Um dos estudos, que utilizou 82 swabs retais e peri-retais pareados obtidos de 13 pacientes sabidamente colonizados por VRE, encontrou sensibilidade de 79% tanto para os swabs retais quanto para os peri-retais e, especificidade de 87% e 86% para os swabs retais e peri-retais respectivamente (WEINSTEIN *et al.*, 1996). Este estudo também mostrou haver 100% de concordância nos resultados de swabs retais e peri-retais coletados simultaneamente, além do número de colônias que foi semelhante nas duas técnicas de coleta.

Estudo mais recente avaliou as culturas de 35 amostras de fezes de 13 pacientes que eram sabidamente colonizados por VRE, e encontrou sensibilidade de 58% para o swab retal em comparação à cultura de fezes. Estes autores chamaram

a atenção para a elevada taxa de swabs retais com resultados falso-negativos quando a densidade de VRE nas fezes era baixa, tendo oscilado entre 100% e 0% quando a densidade de VRE foi $\geq 7,5 \log_{10}$ ufc/g de fezes e de $\leq 4,5 \log_{10}$ ufc/g de fezes, respectivamente. A concentração de colônias de VRE presentes nas fezes, esteve diretamente relacionada ao êxito na detecção de VRE através de swabs retais e conseqüentemente, a possibilidade de falha na identificação de pacientes colonizados (D'AGATA *et al.*, 2002).

Num estudo realizado em 2008 envolvendo os hospitais norte-americanos que compõem o *National Healthcare Safety Network*, com o objetivo de avaliar os protocolos adotados no manejo de microrganismos multirresistentes, foram encontradas diferenças, entre as quais a adoção ou não de culturas de vigilância. Das 413 unidades de terapia intensiva avaliadas, 59% realizavam o *screening* rotineiramente para MRSA; 22% para VRE; e apenas 12% para bactérias gram-negativas multirresistentes. Em 40% dessas unidades todos os pacientes admitidos eram investigados para todos os microrganismos multirresistentes somente no momento da admissão, enquanto que em 27% das unidades o *screening* era realizado periodicamente. Precauções de contato preventivas eram adotadas em 31% das instituições e coorte de pacientes colonizados em 42% delas. A falta de uniformidade nas condutas reflete, provavelmente, as diferenças que existem nas recomendações internacionais (POGORZELSKA; TONE; LARSON, 2012).

A disseminação tanto das enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, como as produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo relevante uma atitude para sua prevenção. Considera-se que o controle desse agravo depende da adoção de um conjunto de estratégias e do rigor em sua implementação. Falhas nas estratégias estão associadas à morbidade e mortalidade, o que demanda avaliação e implementação de planos locais, regionais, nacionais e internacionais (BILAVSKY; SCHAWBER; CARMELI, 2010).

Duas importantes diretrizes foram publicadas com vistas a contribuir para o controle de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, uma pelos CDCs (2009a) e outra por um grupo de especialistas, patrocinado pela *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, os quais possuem várias semelhanças mas também diferenças importantes entre si (BILAVSKY; SCHAWBER; CARMELI, 2010).

Ambos propõem que medidas de intervenção sejam implementadas em conjunto e num tempo único, o que se denomina na linguagem especializada internacional de *bundle*, ou pacote de medidas. Fazem parte deste conjunto quatro recomendações principais, quais sejam: 1) a identificação de pacientes colonizados por cepas produtoras de KPC, através de coleta de culturas de vigilância tanto à admissão quanto periodicamente; 2) adoção de medidas de isolamento, tais como precauções de contato pré-emptivas (preventivas) e coorte de pacientes considerados de alto risco de se encontrarem colonizados à admissão ou a partir de resultados clínicos ou de culturas de vigilância; 3) a melhoria na limpeza e desinfecção de superfícies; 4) descolonização da pele de pacientes, com banhos diários de clorexidina (CDC, 2009a; BILAVSKY; SCHAWBER; CARMELI, 2010). De qualquer maneira, para que um *bundle* ou pacote de medidas de intervenções seja colocado em prática, a condição básica necessária para seu sucesso, está na determinação de que qualquer medida, por mais simples que possa parecer, será efetiva (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2010).

O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) recomenda fortemente que sejam realizadas culturas de vigilância, por meio de *screening* retal, à admissão de qualquer paciente transferido para uma instituição de saúde vindo de outro país. Esta recomendação tem como justificativa a atual mobilidade de pacientes entre os mais diversos destinos, e o desconhecimento dos reservatórios de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, tanto na Europa como em outros continentes. Assim sendo, qualquer paciente transferido de outro país deve ser considerado como de risco para transportar consigo estes patógenos multirresistentes. O ECDC recomenda ainda, com grande ênfase, que todos os países devam desenvolver um documento normativo visando o controle destes microrganismos e que o *screening* conforme aqui mencionado, faça parte das normas a serem seguidas. Países como França, Noruega, Suécia e Israel seguem práticas normatizadas que constituem sua força-tarefa nacional, e seus relatos consistentes têm mostrado que o *screening* é um dos pilares do sucesso na prevenção e controle de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2011).

A prevenção da disseminação de enterobactérias produtoras de carbapenemase depende da detecção precoce e correta de pacientes colonizados durante sua admissão, hospitalização ou transferência entre unidades de internação.

Embora esta afirmação seja consensual, a grande questão continua sendo: pacientes devem ser investigados através das culturas de vigilância? Muitos países têm elaborado guias com recomendações visando ao controle e prevenção de bactérias multirresistentes, nos quais a coleta de culturas de vigilância é apontada como medida necessária a ser adotada nos programas de controle. Apesar das diferenças nestas recomendações, existe consenso nas seguintes condutas: de que o *screening* deva incluir pelo menos pacientes sob risco de colonização, tais como os pacientes que se encontram em unidades de terapia intensiva, em unidades de transplante e pacientes imunossuprimidos; de que ao haver a confirmação de paciente colonizado ou infectado por enterobactéria produtora de carbapenemase, o programa de *screening* seja estendido para os pacientes que compartilhem da mesma enfermaria; e ainda, pacientes transferidos de outros hospitais devem ser submetidos a *screening* independentemente da unidade de admissão (NORDMANN *et al.*, 2012).

Embora exista a recomendação, por parte das autoridades sanitárias nacionais e internacionais, quanto à realização de culturas de vigilância nas situações citadas, as instituições de saúde têm debatido o custo-efetividade da manutenção de um programa de identificação de pacientes colonizados a partir da coleta de culturas de vigilância. Alguns questionamentos que se somam referem-se a quais populações específicas deveriam, de fato, ser investigadas; quais os melhores métodos de coleta de culturas de vigilância; quais os sítios anatômicos mais adequados para se obter amostras para culturas de vigilância; e, ainda, quais os microrganismos que devem ser investigados em programas ativos de vigilância. O grande questionamento refere-se à utilização de culturas de vigilância como estratégia de prevenção de transmissão cruzada de microrganismos multirresistentes nos hospitais (MARAGAKIS; PERL, 2010; SANDORA *et al.*, 2013).

Recente estudo, realizado num hospital universitário na França, se propôs a avaliar o custo da não realização de culturas de vigilância, as quais deixaram de ser realizadas sistematicamente numa unidade de transplante hepático, por provável redução nos recursos assistenciais. A falha na identificação de um primeiro paciente colonizado por VRE resultou num surto envolvendo 13 pacientes. Os custos diretos com o surto representaram o equivalente a €60.524,00, devido aos gastos com equipe assistencial, materiais descartáveis, procedimentos de higiene e culturas de vigilância, acrescidos de €110.915,00 em decorrência da interdição de leitos naquele

período. Os resultados reforçam a importância da adesão ao programa de vigilância de pacientes colonizados, através de culturas de vigilância (ESCAUT; BOUAM; FRANK-SOLTYSIAK, 2013).

As culturas de vigilância também possibilitam o controle concomitante de vários microrganismos multirresistentes, na medida em que a colonização de um mesmo paciente por mais de um patógeno multirresistente tem sido descrita, sendo denominada de co-colonização (HARRIS *et al.*, 2004). No estudo mencionado, 47% dos pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de ESBL também eram colonizados por VRE, e ao serem instituídas medidas de controle visando a um destes patógenos, o impacto sobre o segundo foi observado. Relato semelhante ocorreu em hospital universitário na cidade de Bologna, Itália, que ao instituir a coleta de culturas de vigilância através de swab retal, a partir de um caso de paciente portador de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, foram detectados 8 pacientes colonizados por *Citrobacter freundii* produtor de metalo-beta-lactamase. Os resultados demonstraram que as medidas de vigilância para enterobactérias produtoras de carbapenemase também possibilitaram a identificação e o controle de outros patógenos multirresistentes (GAIBANI *et al.*, 2013).

A recomendação dos CDCs quanto à importância da realização de culturas de vigilância para detecção de colonização por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos foi reafirmada em estudo realizado em Israel, que demonstrou que as culturas de vigilância permitiram a identificação de aproximadamente dois terços dos pacientes colonizados por estes patógenos. As culturas de vigilância evitaram que estes pacientes permanecessem sendo fonte não identificada, o que teria resultado na colonização e/ou infecção de novos pacientes. Através deste estudo, ficou também demonstrada a importância do corte de pacientes colonizados, assistidos por equipe treinada e dedicada, o que garante que mesmo havendo falhas na higienização de mãos (se considerada ser esta a via principal de disseminação de patógenos) pacientes não colonizados não seriam expostos a risco de transmissão cruzada (COHEN *et al.*, 2011). A adoção de precauções de contato para pacientes colonizados/infectados, como medida isolada de intervenção, se mostrou falha, provavelmente em decorrência da baixa adesão à higienização de mãos e falhas na desinfecção do ambiente.

Resultado semelhante foi encontrado em um hospital da Grécia, que documentou a disseminação e o controle de cepas de *Klebsiella pneumoniae*

produtoras de carbapenemase, num período de três anos, de janeiro de 2009 a dezembro de 2011. Durante este período, medidas de controle de infecção foram implementadas e, posteriormente, acrescidas da adoção de culturas de vigilância, através de swabs retais à admissão, e precauções de contato, no terceiro ano, o que resultou em redução dos índices de infecção de 0,52/1.000 pacientes-dia, para 0,21/1.000 pacientes-dia ($p=0,0028$). O estudo concluiu que medidas rigorosas de controle de infecção acrescidas da adoção de culturas de vigilância, podem efetivamente reduzir a incidência de transmissão cruzada de patógenos produtores de carbapenemase. E, também, que a cooperação entre o laboratório de microbiologia, a equipe do serviço de controle de infecção hospitalar e a equipe assistencial são fundamentais na elaboração e implementação de medidas de controle para estes patógenos, com ênfase nas culturas de vigilância (POULOU *et al.*, 2012).

Uma vez que a via principal de transmissão de microrganismos entre pacientes são as mãos dos profissionais da área da saúde, a identificação precoce de pacientes colonizados por patógenos multirresistentes e a instituição de precauções de contato para estes pacientes são consideradas medidas de grande importância na prevenção da disseminação, particularmente em situações de surto (DOI *et al.*, 2011; ARVANITI, *et al.*, 2012).

Acredita-se que os profissionais de saúde, de posse destas informações, terão maiores cuidados e maior adesão à higiene de mãos, tendo como resultado a redução de transmissão cruzada de patógenos no ambiente hospitalar. Ainda neste raciocínio, a experiência de sucesso do Estado de Israel no controle de cepa epidêmica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), que em 2006 foi isolada em todos os hospitais israelenses importantes, teve como uma das medidas centrais de intervenção, a adoção de culturas de vigilância para pacientes de alto risco. Por ser o trato gastrointestinal de pacientes colonizados o reservatório para transmissão cruzada deste patógeno no ambiente hospitalar, culturas de vigilância foram consideradas uma ferramenta essencial na prevenção de sua disseminação (SCHWABER *et al.*, 2011).

A emergência de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos no cenário mundial, e a crescente preocupação das autoridades sanitárias e dos profissionais das áreas de controle de infecção e assistenciais com a gravidade da situação, levaram os CDCs e o HICPAC (*Healthcare Infection Advisory Committee*)

a publicar, em março de 2009, um guia específico para o seu controle, intitulado *Guidance for Control of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Acute-Care Facilities* (CDC, 2009a).

Em 2012, outro guia ampliando as recomendações do primeiro, o CRE Toolkit (*Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) foi publicado. A proposta deste novo guia é a orientação de medidas adicionais a serem adotadas em instituições de saúde, nas quais as medidas básicas de prevenção e controle não estejam sendo efetivas na redução de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos. As duas medidas adicionais recomendadas são a coleta de culturas de vigilância e realização de banho com clorexidina degermante (CDC, 2012b).

As culturas de vigilância, de acordo com esta recomendação dos CDCs, devem estar voltadas não apenas para pacientes com *link*-epidemiológico com pacientes portadores de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, mas também para determinados pacientes que compõem um grupo considerado de alto risco para aquisição destes patógenos. Os critérios para que pacientes sejam incluídos neste grupo são: 1) pacientes transferidos de instituições ou áreas com alta prevalência de Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, como por exemplo, casas de apoio para cuidados a pacientes crônicos ou unidades de terapia intensiva; 2) pacientes com presença de fatores de risco invasivos; 3) pacientes admitidos em unidades de alto risco, como unidades de terapia intensiva. Para estes pacientes, a recomendação é de que as coletas de culturas de vigilância sejam realizadas à admissão e periodicamente, sugerindo-se que sejam semanais. Recomenda-se, ainda, a adoção de precauções preventivas durante o período de aguardo do resultado da cultura de vigilância e, em sendo positivo, precauções de contato deverão ser instituídas; em sendo negativo, as precauções poderão ser suspensas (CDC, 2012b).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), igualmente preocupada com a epidemiologia desses agentes no Brasil e, em particular, no Estado do Rio Grande do Sul, frente aos recentes relatos de isolados de enterobactérias com um novo mecanismo de resistência, lançou no dia 14 de junho de 2013 um plano para enfrentamento de microrganismos multirresistentes, intitulado Plano de Contingência dos Mecanismos de Resistência nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde por Enterobactérias do Estado do Rio Grande

do Sul (BRASIL, 2013c). De acordo com a ANVISA o referido plano foi elaborado para ser aplicado, sob a coordenação da vigilância sanitária estadual, em serviços de saúde que possuam unidades de terapia intensiva e serviços de emergência. Esta determinação decorreu do relato de surto de infecção/colonização na UTI de um dos hospitais de Porto Alegre, por *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae*, que possuíam o mecanismo de resistência NDM-1 (*New Delhi Metallobetalactamase*). Dois comunicados de risco já haviam sido previamente emitidos, com a finalidade de alertar os profissionais da área de saúde, especialmente aqueles vinculados ao controle de infecção hospitalar, para a possibilidade de que esta cepa pudesse ser isolada no Brasil (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b; BRASIL, 2013c).

Programas voltados para a prevenção e controle de enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido devem incluir a realização de culturas de vigilância no momento da admissão de pacientes, como um dos componentes (LOWE, 2013). Neste sentido, uma das estratégias de controle de microrganismos multirresistentes adotadas pelas instituições de saúde que utilizam a coleta de culturas de vigilância em seus programas, tem sido o *screening* de pacientes à admissão. Esta medida tem sido considerada um dos componentes efetivos das intervenções de controle de microrganismos multirresistentes, especialmente em surtos, e diversos autores demonstraram a importância destas medidas no controle de enterobactérias produtoras de ESBL e KPC (LUCET *et al.*, 1999; BEN-DAVID, 2010; CARMELI *et al.*, 2010). Estas medidas também estão descritas em vários diretrizes de controle de microrganismos multirresistentes, como o da SHEA (*The Society for Healthcare Epidemiology of America*), com recomendações específicas para MRSA e VRE (MUTO *et al.*, 2003).

Pesquisa recente desenvolvida no Canadá, a fim de avaliar quais eram as medidas adotadas nos hospitais canadenses para o controle de enterobactérias produtoras de ESBL e KPC, revelaram que aproximadamente 50% dos hospitais realizavam culturas de vigilância na admissão de pacientes (LOWE *et al.*, 2012). Frente a estes resultados, os pesquisadores realizaram um estudo de corte retrospectivo a respeito da incidência de enterobactérias produtoras de ESBL em seis hospitais de Toronto que realizavam culturas de vigilância à admissão, e em seis hospitais nos quais as culturas não eram realizadas. Foram analisados os resultados de culturas clínicas e de vigilância positivos para enterobactérias

(*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*) produtoras de ESBL, no período de 2005 a 2009. Para os hospitais que realizavam culturas de vigilância, as coletas eram feitas através de swabs retais, sendo que quatro dos hospitais adotavam o critério de coleta baseada em fatores de risco, enquanto que os outros dois utilizam o *screening* universal. As coletas baseadas em fatores de risco foram realizadas de acordo com os seguintes critérios: pacientes que viajaram para países endêmicos para estes patógenos; história prévia de colonização/infecção por enterobactéria produtora de ESBL; hospitalização prévia; transferência de casas de apoio (*long-term care facility*); admissão em unidades específicas como UTI-Adulto e Neonatal, Clínica Médica ou Cirúrgica; ou pacientes apresentando diarreia ou feridas secretantes (LOWE *et al.*, 2013).

Um dos aspectos interessantes deste estudo foi a apresentação das estratégias de controle para enterobactérias produtoras de ESBL adotadas pelos 12 hospitais avaliados, sendo estas semelhantes entre si. A adoção de quarto privativo para pacientes colonizados/infetados por enterobactéria produtora de ESBL foi mais comum nos hospitais que adotavam a coleta de culturas de vigilância (4/6 vs. 2/6). Dois hospitais que realizavam *screening* e três hospitais que não realizavam o *screening* adotavam precauções de contato apenas para pacientes com risco aumentado de transmissão de ESBL, como pacientes incontinentes ou com feridas drenantes. Em todos os hospitais, precauções de contato só eram instituídas após os resultados positivos das culturas clínicas ou de vigilância. Nenhum hospital realizava culturas de vigilância regularmente para bactérias produtoras de ESBL; somente culturas de admissão. Houve diferenças com relação ao tempo de permanência dos pacientes em precauções de contato, variando entre a suspensão após uma cultura negativa, até suspensão após três culturas negativas com intervalos de uma semana (LOWE *et al.*, 2012).

Os resultados mostraram uma variação na incidência global de bactérias produtoras de ESBL, a partir das culturas clínicas dos 12 hospitais estudados de 0,11 casos/1.000 pacientes-dia, em 2005, para 0,42 casos/1.000 pacientes-dia, em 2009. Quanto às culturas de vigilância à admissão, a taxa média foi de 550/1.000 admissões, nos 6 hospitais que realizam o *screening* na admissão. Nestes hospitais, o número total de culturas de vigilância positivas por ano aumentou de 101 (5,4 /1.000 admissões) em 2005, para 660 (35,5/1.000 admissões) em 2009. Outro dado relevante que o estudo mostrou, foi que, em 2005, havia um maior número de casos

de ESBL nos hospitais que não adotavam culturas de vigilância à admissão, comparado aos que adotavam (0,098 *versus* 0,034/1.000 pacientes-dia). Esta diferença se manteve ao longo dos anos, até que em 2009 a incidência de enterobactérias produtoras de ESBL aumentou de 0.184 vs. 0,097/1.000 pacientes-dia, nos hospitais que não realizavam *screening*, comparado aos que realizavam. As taxas de bacteremia associadas a enterobactérias produtoras de ESBL, também foram 64,1% menores nos hospitais que realizavam o *screening*, nos 5 anos analisados (LOWE *et al*, 2013).

O estudo também mostrou que 72% dos pacientes não teriam sido identificados se não tivessem sido submetidos a culturas de vigilância à admissão, pois estes não apresentaram cultura clínica positiva para ESBL no decorrer da hospitalização. Este dado reforça a indicação primária das culturas de vigilância (SIEGEL, 2007), e reafirma que culturas de vigilância realizadas na admissão de pacientes devem fazer parte dos programas de prevenção e controle de enterobactérias produtoras de ESBL (GODDARD, S.; MULLER, M.P., 2011). Tal medida, associada à adoção de precauções de contato e quarto privativo, mostrou-se efetiva, pois contribuiu para a baixa incidência de casos de enterobactérias produtoras de ESBL de origem hospitalar, incluindo casos de bacteremia, observados nos hospitais de Toronto (LOWE *et al*, 2012).

A adoção de coorte de pacientes infectados ou colonizados por microrganismos multirresistentes também tem sido uma das importantes medidas instituídas na prevenção de sua disseminação, estando diretamente associada à coleta de culturas de vigilância. A identificação de pacientes colonizados acompanhada pela adoção de precaução de contato é fundamental (CDC, 2006).

O impacto da adoção de coorte para pacientes colonizados/infectados por microrganismos multirresistentes foi avaliado recentemente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após ter sido criada uma área exclusiva para assistência a estes pacientes. Esta medida trouxe significativa tendência de redução na incidência de infecção por microrganismos multirresistentes na instituição (0,65 para -1,04; $p < 0,01$), especialmente observada para infecções causadas por VRE e *Pseudomonas aeruginosa*. A criação de uma unidade exclusiva para coorte de pacientes com microrganismos multirresistentes também resultou em melhora nos cuidados voltados à prevenção de infecções, especialmente a adesão à higiene de mãos (STUMPFS *et al.*, 2013).

Uma vez que não existe consenso, até o momento, em relação ao melhor sítio anatômico de coleta de culturas de vigilância para os microrganismos multirresistentes, principalmente em se tratando de bactérias gram-negativas, vários têm sido os esforços feitos no sentido de elucidar esta questão (DOI *et al.*, 2011); da mesma forma, a necessidade de se estabelecer a melhor estratégia para a investigação, isto é, um sítio ou múltiplos sítios (JANS *et al.*, 2013), também tem sido estudada.

Pesquisadores têm tentado estabelecer o sítio anatômico de maior sensibilidade para cada microrganismo multirresistente em particular. Estudo realizado em Israel comparou seis sítios anatômicos diferentes (narinas, orofaringe, pele, região retal, feridas e aspirados endotraqueais), com o objetivo de determinar os mais apropriados para identificação de *Acinetobacter baumannii*, e sua persistência de colonização. Foram encontrados índices de sensibilidade baixos, tanto na análise isolada de cada sítio, variando de 13,5% a 29%, como para os 6 sítios em conjunto, sendo a sensibilidade neste caso, de apenas 55%. O sítio isolado que teve a maior sensibilidade foi o aspirado endotraqueal. Quanto à persistência de colonização, 17% dos pacientes persistiram colonizados após um período médio de 17,5 meses da última cultura clínica positiva para *Acinetobacter baumannii*, sendo que, para estes pacientes, os sítios positivos foram a pele e a orofaringe (MARCHAIM *et al.*, 2007). Este estudo possibilitou importantes discussões em torno do tempo que os pacientes permanecem colonizados, tendo sido demonstrado que este tempo foi longo e, além disto, que num protocolo de investigação de colonização não foi suficiente avaliar um único sítio anatômico, sendo esta a prática da maioria das instituições que adotam culturas de vigilância.

Em busca da definição do melhor sítio anatômico e da técnica de coleta que possa resultar em maior sensibilidade, pesquisadores da Universidade de Pittsburgh, Estados Unidos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade das culturas de vigilância para detecção de *Acinetobacter baumannii*, substituíram os swabs convencionais por “esponjas”, para que a superfície cutânea a ser investigada pudesse ser ampliada. Também adotaram a estratégia da utilização de um meio de cultura enriquecido que promovesse o crescimento seletivo. Pacientes foram submetidos a coletas simultâneas, utilizando-se 7 swabs de rayon e 3 esponjas. Os swabs foram utilizados nas coletas das regiões inguiniais, axilares, interdigitais dos pés, narinas, orofaringe, fossa antecubital e testa, em áreas de 5x5 cm. As esponjas

foram utilizadas nas coletas das regiões da testa, parte superior dos braços e coxas, em áreas de 11 cm. Os materiais coletados foram então colocados em meio nutritivo e incubados para enriquecimento, sendo observados após 1h e 24hs. Entre os sítios submetidos à coleta com swab, a orofaringe foi o sítio único mais sensível, após uma hora de enriquecimento. No entanto, após 24 horas de enriquecimento, a região inguinal apresentou sensibilidade semelhante à da orofaringe, com 48,9%. A melhor combinação de sítios de coleta com swab foram as regiões de orofaringe com inguinal, após 24 horas de enriquecimento, com sensibilidade de 77,8%. Os sítios coletados com esponjas tiveram, porém, sensibilidade maior do que a região de orofaringe, que havia sido o sítio mais sensível através da coleta com swab. A região da coxa apresentou sensibilidade de 82,6%, que foi significativamente mais alta do que a da região de orofaringe ($p < 0,003$) e da região inguinal ($p = 0,0003$), e a combinação da região da coxa com parte superior do braço foi de 89,1% (DOI *et al.*, 2011).

Este estudo trouxe como contribuição a constatação de que é necessário que o material coletado seja colocado em meio de enriquecimento, durante 24 horas, antes de ser semeado em meio seletivo, a fim de melhorar a sensibilidade, considerando que muitas vezes o inóculo inicial dos materiais coletados é baixo. Outra constatação relevante foi a de que pacientes intubados apresentavam a região de orofaringe densamente colonizada por *Acinetobacter baumannii*. Por fim, os pesquisadores defenderam a estratégia de coleta de culturas de vigilância utilizando-se esponjas, considerando que se trata de técnica simples e que aumenta, significativamente, a sensibilidade para a detecção dessas bactérias quando comparada à coleta com swabs. Para aumentar a sensibilidade destas culturas eles consideraram fundamental a combinação de dois sítios anatômicos, o que seria facilitado através da técnica com esponjas. A utilização de esponjas permite a coleta simultânea de dois sítios distintos, no caso, região da coxa e do braço, com uma única esponja, o que não seria tão simples se as coletas fossem feitas através de um único swab, no caso, orofaringe e região inguinal (DOI *et al.*, 2011).

Um recente estudo realizado em hospital militar terciário, em Washington, Estados Unidos, com pacientes compostos por combatentes nos conflitos do Iraque e do Afeganistão, mostrou alta prevalência de colonização por bacilos gram-negativos multirresistentes. Foram avaliados seis diferentes sítios anatômicos, com o objetivo de determinar a história natural da colonização por bactérias gram-negativas

multirresistentes. Para tanto, culturas de vigilância foram coletadas com intervalos predeterminados dos seguintes sítios anatômicos: região axilar, inguinal, peri-retal, interdigital das mãos e dos pés e testa. Um dos resultados do estudo foi ter encontrado a região inguinal como o sítio anatômico mais sensível nas culturas de vigilância para a detecção da colonização por gram-negativos multirresistentes (WEINTROB *et al.*, 2010). A sensibilidade encontrada foi de 84%, se considerados os vários gram-negativos multirresistentes, e de 100%, se considerada apenas *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL.

Outro importante estudo realizado na Suíça, no período de novembro de 2006 a abril de 2009, com o objetivo de determinar a taxa de colonização inguinal em pacientes portadores de enterobactérias produtoras de ESBL, concluiu que a pele da região inguinal é um importante sítio de colonização em pacientes infectados ou colonizados por essas bactérias. No período do estudo foram avaliados 75 pacientes previamente colonizados por enterobactérias produtoras de ESBL, em relação à região perianal, inguinal e urina, dos quais 57 encontravam-se hospitalizados. Colonização inguinal foi encontrada em 36 (63%) de 57 pacientes; colonização perianal em 42 (70%) de 60 pacientes e colonização da urina em 47 (72%) de 65 pacientes. A colonização inguinal foi mais comum em pacientes hospitalizados do que em pacientes ambulatoriais (73% *versus* 27%) ($p=0,01$). Estes resultados demonstraram que a colonização da pele foi comum em pacientes portadores de enterobactérias multirresistentes e pode ser importante na transmissão nosocomial destes patógenos (BUEHLMANN *et al.*, 2010).

O sítio inguinal foi novamente avaliado em estudo realizado em Chicago, Estados Unidos, com o objetivo de determinar os sítios anatômicos de colonização para *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, em que amostras de quatro diferentes sítios cutâneos foram avaliadas (inguinal, axilar, fossa antecubital e região dorsal superior), além do orifício de traqueostomia, quando presente, ou de orofaringe, quando a traqueostomia não estava presente, e ainda, urina e swab retal. O estudo apontou como resultado que, dos pacientes que tiveram pelo menos um sítio anatômico positivo para a bactéria em estudo, houve positividade num dos sítios cutâneos em 96% dos casos. E, ainda, que o sítio anatômico único mais sensível foi o sítio retal, com 88% de sensibilidade, seguido pelo sítio inguinal, com 79% de sensibilidade. Mas, quando combinados os dois sítios, retal e inguinal, foi

possível detectar todos os pacientes colonizados, com 100% de sensibilidade (THURLOW *et al.*, 2013).

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo estabelece o sítio inguinal, seguido do retal, em coleta única, como rotina de coleta de culturas de vigilância para detecção de enterobactérias produtoras de ESBL ou KPC. Para a pesquisa de VRE, estabelece a coleta de swab retal ou coleta de fezes; e, para a investigação de pacientes colonizados por *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos estabelece, além da coleta de swab retal ou coleta de fezes, a coleta de amostra de urina de pacientes com sonda vesical de demora, e secreção traqueal de pacientes em ventilação mecânica e cultura de lesões de pele. Esta recomendação consta do Manual intitulado Guia de Utilização de Anti-Infeciosos e Recomendações para a Prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, elaborado pelo Grupo e Subcomissões de Controle de Infecção Hospitalar daquela instituição (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, 2012).

A rápida disseminação de enterobactérias produtoras de carbapenemases com abrangência mundial representa significativa ameaça à saúde pública. Esforços são necessários para assegurar a rápida detecção destes patógenos e a implementação de estratégias efetivas de controle de infecção. Culturas de vigilância deveriam ser implementadas para todos os pacientes sob risco, e representam um componente essencial para os esforços necessários para prevenir infecções causadas por microrganismos multi e pan-resistentes (NORDMANN *et al.*, 2012).

A realização de culturas de vigilância, conforme evidenciado na literatura, tem sido parte integrante dos protocolos de controle da disseminação de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar. Embora se busque a definição do sítio anatômico ideal para a detecção das várias bactérias multirresistentes, autores ressaltam a importância da coleta de culturas de vigilância. A partir de recente revisão integrativa, pesquisadores constataram que, em 53,1% dos estudos analisados, a realização de culturas de vigilância era parte integrante dos programas de controle de microrganismos multirresistentes em hospitais, novamente reafirmando sua importância (BACKMAN *et al.*, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa é de natureza exploratória com abordagem quantitativa. Trata-se de estudo um epidemiológico, comparativo, prospectivo, controlado, em que foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade do swab inguinal em relação ao swab retal para a detecção de bactérias multirresistentes.

4.2 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada de outubro de 2012 a maio de 2013 em um hospital público federal de grande porte, de nível terciário de atendimento, com 635 leitos cadastrados pelo Sistema Único de Saúde, em diversas especialidades. As unidades de internação selecionadas foram aquelas que tinham rotina de coleta de culturas de vigilância na admissão do paciente e semanalmente, e que, durante o período da pesquisa, apresentaram resultado de swab retal positivo para bactéria multirresistente.

As unidades de internação selecionadas segundo os critérios acima foram: Clínica Médica Feminina, Clínica Médica Masculina, Centro de Terapia Semi Intensiva, Hematopediatria, Quimioterapia de Alto Risco, Transplante de Medula Óssea e Unidades de Terapia Intensiva Cardíaca, Geral, Pediátrica e Neonatal.

As chefias médicas e de enfermagem das unidades de internação foram contactadas e solicitada, por meio de carta, a autorização para a realização da pesquisa, contendo em anexo o projeto de pesquisa e o parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Os custos para a coleta das amostras foram financiados pelo hospital do estudo e os custos para o processamento laboratorial das amostras e análise dos dados, pelas pesquisadoras.

4.3 PARTICIPANTES DA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa em 30 de maio de 2012, sob o Protocolo CEP/SD: 1322.023.12.04 (Anexo 1) e atendeu aos aspectos éticos no que concerne à participação voluntária, possibilidade de desistência a qualquer momento da pesquisa, sigilo dos dados, anonimato dos participantes e divulgação dos resultados apenas para fins científicos.

Os pacientes adultos e em condições de responder por si e os responsáveis legais daqueles com idade inferior a 18 anos e dos que não pudessem responder por si foram devidamente informados sobre os objetivos da pesquisa e os procedimentos de coleta de dados. Os pacientes adultos e em condições de responderem por si e os responsáveis legais daqueles que não pudessem responder por si assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Os responsáveis legais de participantes menores de 18 anos, após esclarecidos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pais de Filhos Menores de 18 anos (Apêndice 2), acrescido do Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (Apêndice 3) assinado pelos participantes com idade entre 12 e 18 anos. A cada participante foi atribuído um código, utilizado para preservar o anonimato nas etapas de coleta, processamento de dados e de espécimes clínicos.

Foram *critérios de inclusão no estudo*: ser paciente internado, independentemente de idade, sexo ou doença de base. A partir das informações emitidas diariamente pelo Laboratório de Bacteriologia, com os resultados positivos para bactérias multirresistentes em swab retal, os pacientes ainda hospitalizados e sabidamente colonizados (aqui denominados participantes do Grupo A) foram progressivamente incluídos no estudo. Para cada participante do Grupo A, foi incluído outro, internado na mesma Unidade de Internação e que apresentasse a maior semelhança possível, quanto a sexo, idade, diagnóstico clínico e tempo de hospitalização, e cuja condição de colonização não fosse conhecida (ausência de resultado de swab retal) ou swab retal coletado com resultado negativo (esses participantes compuseram o Grupo B).

Foram *critérios de exclusão do estudo*: pacientes cujos resultados do primeiro e do segundo swab inguinal fossem discordantes em relação à positividade ou negatividade, ou seja, um resultado positivo e outro negativo na coleta inguinal foi

fator para a exclusão do estudo. Esta decisão foi baseada no fato de termos duas culturas inguinais e uma retal coletada, a retal coletada concomitantemente com uma das inguinais, como caracterizado no item 4.5, deste modo, não privilegiando os resultados positivos de swab inguinal em relação ao retal.

4.4 CÁLCULO DA AMOSTRA

A amostra foi determinada com base em estudo piloto realizado de outubro de 2012 a novembro de 2012, que incluiu 30 participantes pertencentes ao Grupo A e 30 ao Grupo B, totalizando 60 participantes. O cálculo da amostragem foi realizado com margem de erro de 10%. Os participantes incluídos no estudo piloto foram incorporados à amostragem final de 150 participantes.

4.5 COLETA DE DADOS

4.5.1 Coleta de material

De cada participante (do Grupo A e do Grupo B) foram coletados dois swabs inguinais, em dias consecutivos, e um swab retal, juntamente com um dos swabs inguinais, pela pesquisadora ou por uma auxiliar de pesquisa, previamente treinada.

A coleta das amostras foi realizada em duas etapas, conforme os itens 4.5.1.1 e 4.5.1.2.

4.5.1.1 Primeira etapa

Uma vez selecionado o participante do Grupo A e confirmada sua permanência no hospital, a pesquisadora se dirigia ao posto de enfermagem da

unidade de internação, a fim de se apresentar à equipe e, de comum acordo com o enfermeiro responsável por aquele Serviço, confirmar a possibilidade de participação do paciente previamente selecionado, levando em conta as particularidades de cada paciente, planos de alta ou de realização de procedimentos programados que impediriam ou dificultariam as coletas inguinais e retal. Neste momento, o enfermeiro da unidade de internação auxiliou a pesquisadora a selecionar outro paciente para compor o Grupo B.

Uma vez confirmados os pacientes, a pesquisadora se dirigia aos mesmos a fim de convidá-los a participar da pesquisa, explicando detalhadamente o procedimento ao qual seriam submetidos, caso aceitassem participar da pesquisa. Pacientes lúcidos, contactantes e maiores de idade foram abordados diretamente; para pacientes não contactantes ou menores de idade, a abordagem foi realizada com o responsável legal. Tendo sido aceito o convite de participação, foram entregues a eles o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pais de Filhos Menores de 18 anos, ou o Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido, dependendo de cada caso, sendo necessária a assinatura e a rubrica de cada participante e/ou responsável.

Cumprida esta etapa, a pesquisadora identificava o leito ou a porta do box ou quarto do participante, com uma placa verde, com os dizeres: “Por gentileza, não higienizar o paciente antes da coleta de swab inguinal” - Pesquisa: Culturas de Vigilância para Detecção de Enterobactérias Multirresistentes”, nome e telefone celular da pesquisadora. Nesta placa também constavam as duas datas de coleta inguinal, a fim de lembrar a equipe de enfermagem de que o banho diário do paciente deveria ser feito somente após a coleta do swab inguinal.

4.5.1.2 Segunda etapa

A segunda etapa se refere à coleta dos swabs propriamente dita. A rotina para a coleta de swab inguinal foi descrita pela pesquisadora (Apêndice 4) devido à ausência de sua descrição em manuais de rotinas laboratoriais de coletas microbiológicas e, tampouco, em artigos oriundos de pesquisas que empregaram esta técnica, mesmo após contato com os autores de estudos afins. Ressaltamos na

rotina elaborada para esta pesquisa a padronização de solução fisiológica 0,9% estéril, para umedecer o swab bacteriológico, utilizando-se duas gotas para cada lado (direito e esquerdo) da região inguinal; o posicionamento do participante, em decúbito dorsal, com as pernas estendidas ou fletidas, desde que haja presença de prega cutânea; a fricção do swab umedecido em região inguinal bilateral, com 15 movimentos de vaivém em cada lado; a coleta do swab inguinal, obrigatoriamente, antes do banho diário do participante, para evitar sua interferência na recuperação de patógenos multirresistentes no sítio de coleta; e a delimitação da área da coleta entre a crista ilíaca e a sínfese púbica, bilateralmente.

Para a coleta de swab retal foi empregada a rotina institucional vigente (Anexo 2).

Para a coletas de swabs, além do material próprio, em caso de o participante ser do Grupo A, a pesquisadora utilizou avental de contágio verde ou laranja, conforme o microrganismo multirresistente colonizante de cada participante, preencheu os campos de identificação do kit bacteriológico, com nome e número de registro de prontuário do participante, além da identificação do material e data de coleta. As coletas foram iniciadas sempre pelos participantes com swab retal negativo ou não realizados. Nos casos em que houve mais de um participante colonizado selecionado por unidade de internação, a coleta foi iniciada observando-se o grau de resistência do microrganismo multirresistente, na seguinte ordem: enterobactérias ESBL, VRE, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias KPC. E, no caso de haver necessidade de coletas concomitantes em unidades diferentes, foi adotado além do critério anterior, também o critério epidemiológico da unidade e de vulnerabilidade de seus pacientes, iniciando-se pela Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, Transplante de Medula Óssea, Quimioterapia de Alto Risco, Hematopediatria e Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (preferencialmente nesta sequência), sendo as últimas, a Unidade de Terapia Intensiva Adultos e Centro de Terapia Semi-Intensiva.

Ao término de cada coleta foi preenchido o instrumento elaborado para esta pesquisa (Apêndice 5) com dados de identificação e possíveis fatores de interferência sobre a colonização, entre outros.

Terminadas as coletas do período, o material foi encaminhado ao Laboratório de Bacteriologia no prazo máximo de duas horas, juntamente com a requisição eletrônica dos exames de cultura. Assim, no caso de resultado positivo

para microrganismo multirresistente, a liberação do resultado seguiu a mesma rotina das demais amostras de cultura de vigilância da instituição, o que garantiu que, para novos pacientes identificados como colonizados, fossem imediatamente instituídas as medidas de precauções de contato.

4.5.2 Processamento laboratorial

Os swabs inguinal e retal foram registrados ao darem entrada na Seção de Bacteriologia e os resultados foram emitidos pelo Sistema Informatizado Hospitalar, conforme rotina institucional padronizada para liberação de resultados microbiológicos e transcritos pela pesquisadora para o Instrumento de Coleta (Apêndice 5). O processamento e análise laboratorial das amostras ficaram sob a responsabilidade do Laboratório de Bacteriologia do hospital do estudo, supervisionados por um bioquímico responsável, observando-se as seguintes etapas:

4.5.2.3 Identificação fenotípica

Cada swab retal e inguinal foi semeado em duas placas distintas: ágar MacConkey (MC) com 2 mg/ml de cefotaxima (CTX) e ágar bile esculina-azida (BEA), contendo 0,8mg/ml de vancomicina. Em seguida, cada swab foi introduzido em tubo de ensaio estéril contendo 5 ml de caldo tríptico de soja ou *Trypticase Soy Broth* (TSB) e, após homogeneização com vortex, o swab foi pressionado contra a parede do tubo para descarregar todo o líquido e logo a seguir descartado. No caldo foi adicionado um disco de meropenem (10mcg). Os caldos e as placas de meio de cultura foram incubados de 16 a 18 horas em estufa comum, a 35-37°C.

No dia seguinte, os caldos foram homogeneizados e repicados com alça bacteriológica 0,01 ml para uma placa MC sem CTX. Foram aplicados à superfície do ágar, um disco de meropenem e um disco de ertapenem, equidistantes da borda

da placa e entre si, e as placas foram incubadas por 16 a 18 horas em estufa comum, a 35-37°C.

As diferentes colônias isoladas na placa de MC com CTX foram identificadas pelo sistema tradicional (manual) e pesquisadas quanto à produção de ESBL e carbapenemase. A pesquisa destas enzimas foi realizada pelo método dos discos combinados de cefalosporinas (CTX e CAZ) com ácido clavulânico e disco de carbapenêmico (MER ou ERT). As colônias positivas para ESBL foram encaminhadas ao Setor de Biologia Molecular para caracterização genotípica; as colônias resistentes ao carbapenêmico testado foram submetidas ao teste de Hodge para confirmação fenotípica da resistência. As colônias com teste de Hodge positivo foram encaminhadas para caracterização molecular da carbapenemase.

As colônias lactose negativa, oxidase negativa com crescimento em caldo-cérebro-coração ou *Brain Heart Infusion* (BHI) incubado a 44°C, suspeitas de *Acinetobacter baumannii*, foram identificadas e realizado o antibiograma pelo aparelho automatizado VITEK®2 (bioMérieux). Para as colônias lactose negativa e oxidase positiva foram realizadas provas bioquímicas para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, e antibiograma pelo método de Kirby-Bauer; as cepas resistentes aos carbapenêmicos foram enviadas ao setor de Biologia Molecular para pesquisa de Metalobetalactamase. Tanto as cepas positivas quanto as negativas para este mecanismo de resistência, mas resistentes aos carbapenêmicos, foram incluídas na pesquisa.

Do ágar MC, semeado a partir do caldo TSB, foi realizada a identificação de colônias que ainda não haviam crescido no ágar MC com CTX e ou que haviam crescido no interior do halo de inibição do meropenem, sendo processadas como descrito no parágrafo acima.

As colônias que cresceram em BEA, escurecendo o meio devido à hidrólise da esculina, foram reisoladas em ágar sangue e realizado o teste de suscetibilidade para vancomicina. As que apresentaram resistência à vancomicina, Enterococo resistente a vancomicina (VRE), foram identificadas e tiveram a confirmação da resistência realizada pelo aparelho automatizado VITEK® 2 (bioMérieux).

A avaliação do crescimento bacteriano nos meios de ágar MC com CTX e BEA foi realizada pela contagem das unidades formadoras de colônias de cada espécie isolada e classificadas da seguinte forma: crescimento escasso (até 10 colônias), moderado (de 11 a 50 colônias) e abundante (acima de 50 colônias).

4.5.2.4 Testes fenotípicos de resistência

Para análise de *Pseudomonas aeruginosa* e enterococo vancomicina resistente (VRE), o antibiograma foi realizado conforme padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), usando discos de amicacina (AMI), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), meropenem (MER), imipenem (IMI), polimixina (POL), piperacilina/tazobactam (PTZ) e aztreonam (ATZ) e vancomicina (VAN) para enterococos (VRE). Para *Acinetobacter baumannii* o antibiograma foi realizado pelo aparelho automatizado VITEK® 2 (bioMérieux), sendo testados os seguintes antimicrobianos: amicacina(AMI), ampicilina/sulbactam (SAM), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), meropenem (MER), imipenem (IMI) e colistina.

A suspensão do inóculo foi preparada com colônias puras, em fase log de crescimento, em diluição 0,5 da escala de MacFarland. Essa suspensão foi semeada com swab em placas de ágar Mueller Hinton (MHA) (Oxoid®, Cambridge, UK) e os discos contendo antimicrobianos foram colocados em seguida. As placas foram incubadas por 16 a 18 horas em estufa comum, a 35-37°C. Após este período foi realizada leitura e consideradas multirresistentes as amostras resistentes a carbapenêmicos para *Pseudomonas aeruginosa* e à vancomicina para *Enterococcus*.

Para a determinação de enterobactérias produtoras de ESBL o teste foi realizado pelo método de disco-difusão, utilizando a técnica padronizada pelo CLSI (2013). Foram testados discos de ceftazidima (CAZ) (30 µg) e cefotaxima (CTX) (30 µg), e esses mesmos discos contendo ácido clavulânico (10 µg) (Himedia®, Mumbai, Índia). O aumento do diâmetro do halo de suscetibilidade (≥ 5 mm) na presença do inibidor em comparação aos halos das cefalosporinas não adicionados de ácido clavulânico foi considerado evidência da produção de ESBL (CLSI, 2013).

Para pesquisa de carbapenase, o teste de Hodge foi realizado nas cepas identificadas como enterobactérias que cresceram dentro do halo de inibição do meropenem, ou apresentaram resistência ao disco de ertapenem. O teste foi realizado segundo CLSI (2013), inoculando-se *Escherichia coli* ATCC 25922, em suspensão na escala 0,5 de Mac Farland, diluída 1:10, em uma placa de ágar

Mueller Hinton, colocando-se um disco de meropenem no centro da placa, e amostras de controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC) e controle negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) como estrias do disco até a borda. Foram consideradas produtoras de carbapenemase amostras que favoreceram o crescimento de *Escherichia coli* próximo ao disco do carbapenêmico (CLSI, 2013).

4.5.2.5 Testes genotípicos de resistência

Para a detecção dos genes de resistência foi utilizada a rotina institucional (Anexo 3).

Para a detecção de genes que codificam as ESBL, todas as amostras com sensibilidade reduzida a cefalosporinas de terceira geração foram testadas por PCR para pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. As que foram negativas para ESBL após PCR e sequenciamento dos três primeiros genes foram testadas também para *bla*_{PER}, *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{BES}. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados e o peso molecular dos produtos obtidos estão apresentados no Quadro 1 abaixo a partir de rotinas estabelecidas (POIREL *et al.*, 2000; QUINTEROS *et al.*, 2003; THOMSOM, 1998; WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006). Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR obedeceram o determinado por NOGUEIRA (2011).

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC R AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F CGA CGC TAC CCC TGC TAT T R CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	552
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC R AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG R ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	F GCA CGA TGA CAT TCG GG R AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327
<i>bla</i> _{TEM}	F ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG R CCA ATG CTT AAT TCA GTG ACG	840
<i>bla</i> _{SHV}	F TCA GCG AAA AAC ACC TTG R TCC CGC AGA TAA ATC ACC A	500
<i>bla</i> _{PER}	F TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG R AGCTCAAACCTGATAAGCCGCTTG	540
<i>bla</i> _{OXA-51}	F TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG R TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353
<i>bla</i> _{OXA-23}	F GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501
<i>bla</i> _{OXA-24}	F GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA R AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246
<i>bla</i> _{OXA-58}	F AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599
<i>bla</i> _{GES}	F ATGCGCTTCATTCACGCA R CTATTTGTCCGTGCTCAGG	860
<i>bla</i> _{BES}	F GTG GTT GCT GGT GGT GAT AG R CGG GCT GGG TAA AGT AGA TG	766

QUADRO 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE ESBL E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS. CURITIBA, 2013.

Para detecção dos genes que codificam carbapenemases (KPC) foi utilizada a técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos no Quadro 2 (NAAS *et al.*, 2008; NAAS, 2010). Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR obedeceram ao determinado por NOGUEIRA (2011).

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla_{KPC}</i>	F CTGTCTTGTCTCATGGCC R CCTCGCTGTGCTTGTCATCC	680

QUADRO 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE KPC E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS. CURITIBA, 2013.

As amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foram enviadas à Biologia Molecular para pesquisa de metalo-beta-lactamase (MβL). Os genes para produção de metalo-beta-lactamase foram pesquisados utilizando-se a técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos no Quadro 3 (MENDES *et al.*, 2007). Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR obedeceram ao determinado por NOGUEIRA (2011) (Anexo 3).

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla_{IMP}</i>	F GAATAGGATGGCTTAATTCTC R CCAAACACTACTACGTTATC	188
<i>bla_{SPM}</i>	F CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG R CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798

QUADRO 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE MβL E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS. CURITIBA, 2013.

4.6 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Com base nas informações obtidas no instrumento de coleta de dados de cada participante e dos resultados da análise laboratorial, foi elaborada uma planilha no Programa Excel, e os dados foram processados com auxílio do Programa computacional Statistica® v.8.0. Os resultados obtidos foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvio padrão (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas/categóricas) e apresentados em tabelas.

Para a comparação dos grupos A (pacientes hospitalizados e sabidamente colonizados) e B (pacientes hospitalizados sabidamente não colonizados ou condição de colonização desconhecida) em relação às variáveis quantitativas, foi

considerado o teste *t de Student* para amostras independentes. Para avaliar a associação entre as duas variáveis qualitativas dicotômicas, foi considerado o teste exato de Fisher. Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Para as análises do exame com coleta de swab inguinal, foram combinados os resultados dos dois exames realizados. Sendo assim, foi considerado *negativo* o paciente que teve os dois resultados de swabs coletados negativos, e considerado positivo o paciente com os dois resultados positivos nos swabs inguinais. Para avaliar a qualidade do exame com coleta por meio de swab inguinal, considerando-se o exame de swab retal como padrão ouro (comparação), foram estimados os valores de *sensibilidade*, *especificidade*, *valor preditivo positivo*, *valor preditivo negativo* e *índice de acerto (acurácia)*. Os valores preditivos positivo e negativo foram calculados com base nas prevalências estimadas a partir da amostra da pesquisa. Para estes índices foram construídos intervalos de confiança de 95%. Os resultados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

Para efetuar o cálculo de *sensibilidade* e *especificidade* dos dois métodos de coleta empregados nesta pesquisa, utilizou-se a metodologia apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 – DIAGRAMA PARA O CÁLCULO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE. CURITIBA, 2013.

		SWAB RETAL	
		POSITIVO	NEGATIVO
SWAB INGUINAL	POSITIVO	A	B
	NEGATIVO	C	D

Considera-se que a *sensibilidade* é a propriedade de um teste diagnóstico de detectar uma doença quando ela realmente está presente (quadrantes A e C da Tabela 1). Traduz, portanto, um resultado concordante entre o teste em avaliação e o teste padrão, fornecendo o resultado desejado, chamado de *verdadeiro positivo*. A *sensibilidade* de um teste pode ser calculada por meio da fórmula $S = A/(A+C)$. Quando um teste for pouco sensível, falhará em detectar a doença em alguns indivíduos, representados no quadrante C (falso negativo). Testes com alta *sensibilidade*, que apresentem resultado negativo, mostram que existe grande possibilidade da doença não estar presente (AZEVEDO; GUIMARÃES, 2007). Nesta

pesquisa, *sensibilidade* foi considerada a probabilidade do resultado da coleta do swab inguinal ser positivo dado que o resultado da coleta de swab retal é positivo. Ou seja, se o paciente tem presença de bactéria pelo resultado da coleta de swab retal, a *sensibilidade* representa a probabilidade do resultado da coleta de swab inguinal ser positivo. É a proporção dos indivíduos verdadeiramente positivos.

Especificidade é a propriedade de um teste diagnóstico detectar a ausência da doença quando ela verdadeiramente não está presente. É a proporção dos indivíduos não doentes nos quais o teste foi negativo para a doença, concordando com o teste padrão (nesta pesquisa o swab retal), fornecendo um resultado desejado, chamado de *verdadeiro negativo*. A *especificidade* de um teste pode ser calculada por meio da fórmula $E = D/(B+D)$. Quando um teste for pouco específico, falhará ao detectar a doença em alguns indivíduos não-doentes, representados no quadrante B (falso positivo). Se um teste com alta *especificidade* for positivo, ele praticamente confirma a doença, já que a possibilidade de falso-positivo é pequena (AVEZUM; GUIMARÃES, 2007). Nesta pesquisa, *especificidade* foi considerada a probabilidade do resultado da coleta inguinal ser negativo, dado que o resultado do swab retal é negativo. Ou seja, se o paciente não tem presença de bactéria pelo resultado de coleta retal, a *especificidade* representa a probabilidade do resultado da coleta inguinal ser negativo.

Valor preditivo positivo expressa a probabilidade de um indivíduo ser doente, visto que o resultado do seu teste foi positivo para a doença (resultado do teste alterado em relação ao normal. Pode ser calculado pela fórmula $VPP = A/(A+B)$ (AVEZUM; GUIMARÃES, 2007), considerando a Tabela 1. Nesta pesquisa o *valor preditivo positivo* é a probabilidade de resultado positivo no swab retal dado que o resultado da coleta inguinal é positivo. Ou seja, se o paciente tem resultado positivo no inguinal, o *valor preditivo positivo* representa a probabilidade de que o resultado do retal também seja positivo.

O *valor preditivo negativo* expressa a probabilidade de um indivíduo não ser doente, visto que o resultado do seu teste foi negativo para a doença (resultado do teste normal). Pode ser calculado por meio da fórmula $VPN = D/(C+D)$. Quanto maior for a *sensibilidade* maior será o *valor preditivo negativo*, isto é, maior a probabilidade de, perante um resultado negativo, não haver a doença (AVEZUM; GUIMARÃES; 2007). Nesta pesquisa, o *valor preditivo negativo* representa a probabilidade de resultado negativo no swab retal, dado que o resultado da coleta inguinal é negativo.

Ou seja, se o paciente tem resultado negativo no swab inguinal, o *valor preditivo negativo* representa a probabilidade de que o resultado do swab retal também seja negativo. O *índice de acerto* é igual ao percentual de casos positivos e negativos nos dois exames.

Para fins da apresentação e análise dos resultados, os pacientes foram agrupados. Este agrupamento para a apresentação dos resultados se deu em função das Unidades de Internação em que os participantes se encontravam e características que faziam com que se assemelhassem. Deste modo, foram considerados do grupo Neonatal aqueles com idade até 12 meses incompletos, em uso de fraldas, totalmente dependentes de cuidados, acamados, internados na UTI Neonatal ou na UTI Pediátrica; o grupo UTI Adulto foi composto por aqueles internados em Unidade de Terapia Intensiva de Adultos ou Centro de Terapia Semi-Intensiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir deste momento os pacientes desta pesquisa passarão a ser denominados “participantes”. Partindo da amostra de 150 participantes, dos quais foram coletados dois swabs inguinais em dias consecutivos e um swab retal concomitantemente a uma das coletas inguinais, foram totalizadas 450 amostras (150 retais e 300 inguinais). Nesta amostra, havia 75 participantes com swab retal positivo (grupo A) e 75 participantes com swab retal negativo (grupo B).

Após aplicação dos critérios de exclusão, permaneceram para análise 129 participantes: 58 com swab retal positivo, 71 com swab retal negativo, 53 com swab inguinal positivo e 76 com swab inguinal negativo. De cada participante, foram estudadas duas amostras de swab inguinal e uma de swab retal, totalizando 258 swabs inguinais e 129 swabs retais.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

5.1.1 Caracterização demográfica e desfecho clínico

O tempo de internamento prévio dos participantes da pesquisa teve média de 23,6 dias e mediana de 18 dias. Na Tabela 2 estão apresentadas as características demográficas e o desfecho clínico dos 129 participantes segundo o grupo geral e para os sub-grupos, determinados pelos resultados das culturas dos swabs retais e inguinais .

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E DESFECHO CLÍNICO DOS PARTICIPANTES COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE SWAB RETAL E SWAB INGUINAL (N=129). CURITIBA, 2013.

	GERAL	SWAB RETAL +	SWAB RETAL -	Valor de p (retal)	SWAB INGUINAL +	SWAB INGUINAL -	Valor de p (inguinal)
<i>Pacientes</i>	129 (100%)	58 (45%)	71 (55%)	-	53 (41,1%)	76 (58,9%)	-
<i>Idade Média</i> **							
<i>± DP, Anos</i>	40,1 ± 23,0	49,6 ± 22,2	31,5 ± 20,2	<0,001*	53,9 ± 18,6	29,7 ± 20,4	<0,001*
<i>Sexo</i>							
Feminino	64 (49,6%)	30 (46,9%)	34 (53,1%)		30 (46,9%)	34 (53,1%)	
Masculino	65 (50,4%)	28 (43,1%)	37 (56,9%)	0,725	23 (35,4%)	42 (64,6%)	0,213
<i>Desfecho</i>							
Alta	104 (80,6%)	42 (40,4%)	62 (59,6%)		37 (35,6%)	67 (64,4%)	
Óbito	25 (19,4%)	16 (64%)	9 (36%)	0,044*	16 (64%)	9 (36%)	0,013*

Legenda: DP, desvio padrão; *, significância estatística; ** >1 ano, n=107 .

FONTE: A autora (2013).

Ressalta-se que a idade média do grupo de participantes com resultado positivo tanto na coleta retal, quanto na coleta inguinal foi quase o dobro da idade média no grupo que teve o resultado negativo nestes sítios, havendo significância estatística para as duas coletas, refletindo, provavelmente, maior gravidade destes participantes, além de outros fatores de risco predisponentes para a colonização.

Pacientes idosos (acima de 65 anos) são considerados um dos principais reservatórios de microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar. Estudo realizado por Denkinger e colaboradores (2012), durante 12 anos em hospital terciário, comparou a prevalência de patógenos multirresistentes encontrada na admissão de pacientes idosos e jovens, tendo encontrado taxas duas vezes maiores para VRE e três vezes maiores para os gram-negativos multirresistentes, em pacientes idosos, com aumento progressivo neste período. Observaram ainda que este aumento foi significativamente maior nos pacientes idosos. Desse modo, ressalta-se, ainda, que pacientes idosos apresentam várias comorbidades, o que resulta na necessidade de hospitalizações mais frequentes, com consequente exposição a microrganismos multirresistentes presentes no ambiente hospitalar (POP-VICAS *et al.*, 2008). Denkinger e colaboradores (2012), sugerem que pacientes idosos contribuem, de forma importante, para a entrada de microrganismos multirresistentes nos hospitais.

Os pacientes do sexo masculino e feminino apresentaram resultados equivalentes nos dois subgrupos referentes às coletas retais e inguinais, não havendo significância estatística nos resultados encontrados quanto a risco de colonização retal ou inguinal, o que corrobora os achados de Luvsansharav e colaboradores (2013), que também não encontraram significância estatística quando analisado o gênero de residentes de *nursing homes* entre os portadores e não-portadores de enterobactérias produtoras de ESBL.

A maior parte dos participantes recebeu alta hospitalar, correspondendo a 80,6%, destes, 40,4% receberam alta colonizados por microrganismos multirresistentes em trato intestinal e 35,6% em sítio inguinal.. Este é um dado que chama atenção, pois estes participantes provavelmente modificarão a epidemiologia de patógenos multirresistentes presentes na comunidade (pressão de colonização) e posteriormente poderão vir a influenciar novamente na prevalência de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar (ZAHAR *et al.*, 2010). Dos 25 participantes que foram a óbito, 16 estavam colonizados por microrganismos multirresistentes, tanto no sítio retal como no sítio inguinal. Ressalta-se a maior taxa de mortalidade, isto é, 64% entre os participantes colonizados, com significância estatística nos dois grupos. Pesquisas apontam para o aumento de morbimortalidade associada às infecções por patógenos multirresistentes (CDC, 2006; HIDRON, *et al.*, 2008; ; BILAVSKY; SCHAWBER; CARMELI, 2010; BRASIL, 2013c); considera-se que a colonização antecede os casos de infecção (EHRILCH *et al.*, 2003; ARVANITI *et al.*, 2012).

Também está bem documentado que pacientes que adquirem infecções causadas por microrganismos multirresistentes têm chance maior de óbito comparado às infecções causadas por cepas sensíveis (MARCHAIM *et al.*, 2008). Da mesma forma, Patel e colaboradores (2008) evidenciaram que o risco de mortalidade para pacientes que adquirem *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos durante sua hospitalização pode aumentar em até três vezes.

5.1.2 Caracterização clínica dos participantes e unidades de internação

Foram analisadas potenciais condições de influência para o risco de colonização intestinal e/ou cutânea por patógenos multirresistentes: condição de

mobilidade dos participantes; incontinência urinária; uso de sonda vesical de demora; incontinência fecal; uso de fraldas; e diarreia, apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE SWAB RETAL E SWAB INGUINAL. CURITIBA, 2013.

	GERAL (N=129)	SWAB RETAL +	SWAB RETAL -	Valor de p (retal)	SWAB INGUINAL +	SWAB INGUINAL -	Valor de p (inguinal)
Mobilidade							
Acamados	71 (55%)	37 (52,1%)	34 (47,9%)	0,078	40 (56,3%)	31 (43,7%)	<0,001*
Deambulando	58 (45%)	21 (36,2%)	37 (63,8%)		13 (22,4%)	45 (77,6%)	
Incontinência Urinária							
Com	34 (26,4%)	10 (29,4%)	24 (70,6%)	0,044*	9 (26,5%)	25 (73,5%)	0,067
Sem	95 (73,6%)	48 (50,5%)	47 (49,5%)		44 (46,3%)	51 (53,7%)	
Uso de SVD							
Com	33 (25,6%)	25 (75,8%)	8 (24,2%)	<0,001*	26 (78,8%)	7 (21,2%)	<0,001*
Sem	96 (74,4%)	33 (34,4%)	63 (65,6%)		27 (28,1%)	69 (71,9%)	
Uso de Fralda							
Com	80 (62%)	42 (52,5%)	38 (47,5%)	0,030*	45 (56,2%)	35 (43,8%)	<0,001*
Sem	49 (38%)	16 (32,6%)	33 (67,4%)		8 (16,3%)	41 (83,7%)	
Incontinência Fecal							
Com	32 (24,8%)	13 (40,6%)	19 (59,4%)	0,683	13 (40,6%)	12 (37,5%)	0,260
Sem	97 (75,2%)	45 (46,4%)	52 (53,6%)		40 (41,2%)	64 (66%)	
Diarreia							
Com	19 (14,7%)	11 (57,9%)	8 (42,1%)	0,318	14 (73,7%)	5 (26,3%)	0,002*
Sem	110 (85,3%)	47 (42,7%)	63 (57,3%)		39 (35,4%)	71 (64,6%)	

Legenda: SVD, sonda vesical de demora; *, significância estatística.

FONTE: A autora (2013).

Pouco mais da metade dos participantes encontravam-se acamados e bastante dependentes do cuidado assistencial; esta condição refletiu diretamente na possibilidade de que o banho destes participantes fosse realizado no leito no primeiro grupo, e fosse de aspersão para os demais. Também se observa que os participantes acamados apresentaram maior positividade nos swabs retais em comparação aos que deambulavam, representando 52,1% e 36,2%, respectivamente e no swab inguinal 56,3% e 22,4%.

A incontinência urinária foi observada em apenas 34 (26,4%) dos participantes submetidos à coleta de swab retal, dos quais 22 eram participantes do

grupo caracterizado como Neonatal, em uso de fraldas. Entre os 58 participantes que apresentaram resultado de swab retal positivo, a imensa maioria não era incontinente urinário, ou seja, 82,8% dos participantes. A incontinência urinária não representou fator de risco para colonização inguinal.

A presença de sonda vesical de demora foi observada em apenas 33 dos 129 participantes avaliados; entretanto, o que chama a atenção é que, destes, 25 (75,8%) participantes tiveram swab retal positivo, o que sugere que a presença de sonda vesical de demora possa ter sido um fator de risco para colonização, havendo significância estatística ($p < 0,001$) para o grupo de participantes em uso de sonda vesical de demora, tanto para colonização intestinal quanto inguinal.

Um esforço para diminuir a utilização de sondas vesicais de demora em pacientes crônicos de instituições asilares norte-americanas foi uma das intervenções que pode ter contribuído para a redução da transmissão cruzada de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos. Uma vez que surtos de infecção urinária causados por bactérias gram-negativas multirresistentes foram associados ao uso de cateteres urinários, a redução no uso desses dispositivos pode ter reduzido as oportunidades de transmissão dessas bactérias, pela sua manipulação por profissionais da saúde (SCHABERG; WEINSTEIN; STAMM, 1976; CHITNIS *et al.*, 2012).

Mais da metade dos participantes da nossa pesquisa faziam uso de fraldas, estando presentes em 80 participantes (62,0%), caracterizando a gravidade e/ou dependência dos cuidados assistenciais de enfermagem. O uso de fraldas também se caracterizou como fator de risco para colonização, havendo significância estatística nos dois grupos ($p < 0,001$). Durante a coleta de dados, esta foi uma particularidade que nos chamou a atenção, uma vez que os participantes mais dependentes e graves, lúcidos ou não, estavam em uso de fraldas, não sendo a incontinência o fator determinante para seu uso. Contudo, o uso de fraldas reflete maior dependência e manipulação, e em nossa pesquisa esse fator mostrou significância estatística para a colonização retal e inguinal, como apontado em outros estudos (KAARME *et al.*, 2013; LUVSANSCHARAV *et al.*, 2013). Estes pesquisadores, demonstraram que havia prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL em crianças que faziam uso de fraldas sendo documentada a transmissão cruzada de *Escherichia coli* ESBL no grupo avaliado. O uso de fraldas, para Adam (2008), tem por finalidade conter as excretas e prevenir a contaminação de roupas e

o ambiente, porém a presença de dermatite associada ao seu uso é frequente (ATHERTON, 2004). *Candida albicans* é o microrganismo mais frequentemente associado a estas dermatites (AKIN, 2001). A umidade da pele e o aumento de pH são os principais fatores predisponentes da dermatite causada pelo uso de fraldas. Assim, a região da pele que permanece em contato com fraldas necessita de cuidados especiais de proteção, devido aos efeitos irritativos da urina e das fezes, em consequência da produção de amônia pela degradação das ureases produzidas pela microbiota fecal, que aumentam o pH cutâneo (ADAM, 2008). Acreditamos que estes fatores possam também ter influenciado a colonização por patógenos multirresistentes que encontramos em nossa pesquisa.

A incontinência fecal esteve presente em 32 (24,8%) dos 129 participantes avaliados. Dos 58 participantes com swab retal positivo, apenas 13 (22,4%) eram incontinentes fecais, sugerindo que a incontinência fecal não representou fator de risco para colonização intestinal nestes participantes. Foi observado também que apenas 19 participantes apresentavam diarreia, o que equivale a 14,7% da amostra. Entretanto, destes, 11 participantes (57,9%) tiveram swab retal positivo e 8 participantes (42,1%), swab negativo, não demonstrando aparentemente haver correlação entre presença de diarreia e colonização intestinal. Porém, quando se analisou a presença de diarreia em relação à colonização do sítio inguinal, observamos que 14 (73,7%) dos participantes com diarreia apresentaram resultado de swab inguinal positivo para bactérias multirresistentes, havendo significância estatística ($p=0,002$). A microbiota intestinal constitui-se num dos ecossistemas microbianos mais densamente povoados. Apesar deste microbioma exercer várias funções benéficas à saúde humana, a elevada concentração de microrganismos neste ecossistema também facilita a transferência horizontal de genes de resistência bacteriana a bactérias potencialmente patogênicas (PENDERS *et al.*, 2013). Considerando que o trato gastrointestinal é o principal reservatório de enterobactérias e de bacilos gram-negativos, por conseguinte também será o principal reservatório de cepas multirresistentes destas bactérias (DONSKEY, 2004).

As Unidades de Internação, nas quais se encontravam os participantes no momento das coletas de swabs inguinais e retais, estão representadas na Tabela 4, destacando-se as unidades de Transplante de Medula Óssea e as Unidades de Terapia Intensiva. As Unidades de Neurocirurgia, Infectologia e Pneumologia, apesar de não terem sido unidades inicialmente incluídas no estudo, fizeram parte

do mesmo por terem recebido pacientes colonizados provenientes das Unidades previamente escolhidas, cujos resultados de swab retal positivo, que serviram para a seleção de participantes, só foram conhecidos após a transferência destes pacientes.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS COLETAS RETAIS CONCOMITANTES ÀS COLETAS INGUINAIS POR UNIDADE DE INTERNAÇÃO. CURITIBA, 2013.

UNIDADE DE INTERNAÇÃO	N (%)
Infectologia	2 (1,6)
Unidade de Terapia Intensiva de Adultos	13 (10,1)
Neurocirurgia	3 (2,3)
Clínica Médica Masculina	14 (10,9)
Clínica Médica Feminina	10 (7,8)
Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica	7 (5,4)
Transplante de Medula Óssea	27 (20,9)
Centro de Terapia Semi-Intensiva	16 (12,4)
Quimioterapia de Alto Risco	9 (7)
Unidade de Terapia Intensiva Neonatal	17 (14,2)
Hemato Pediatria	2 (1,6)
UTI Cardíaca	8 (6,2)
Pneumologia	1 (0,8)
Total	129 (100)

FONTE: A autora (2013)

5.2 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS

Dos 129 participantes que compuseram a amostra do estudo, 58 (45%) apresentaram swab retal positivo para bactérias multirresistentes, e os demais 71 (55%) apresentaram resultado negativo (Figura 6). Dos 58 participantes com resultado de swab retal positivo para bactérias multirresistentes, houve prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL. Algumas culturas foram positivas para mais de um gênero de bactéria multirresistente concomitantemente, evidenciando que alguns participantes encontravam-se co-colonizados.

Dos 58 participantes que apresentaram resultado de swab retal positivo, 46 também tiveram positividade no swab inguinal, representando *sensibilidade* de

79,3% do swab inguinal em relação ao retal. Enquanto que, dos 71 participantes com swab retal negativo, 64 tiveram também o resultado inguinal negativo, representando a *especificidade* de 90,1% do swab inguinal em relação ao retal, como apresentado na Figura 6.

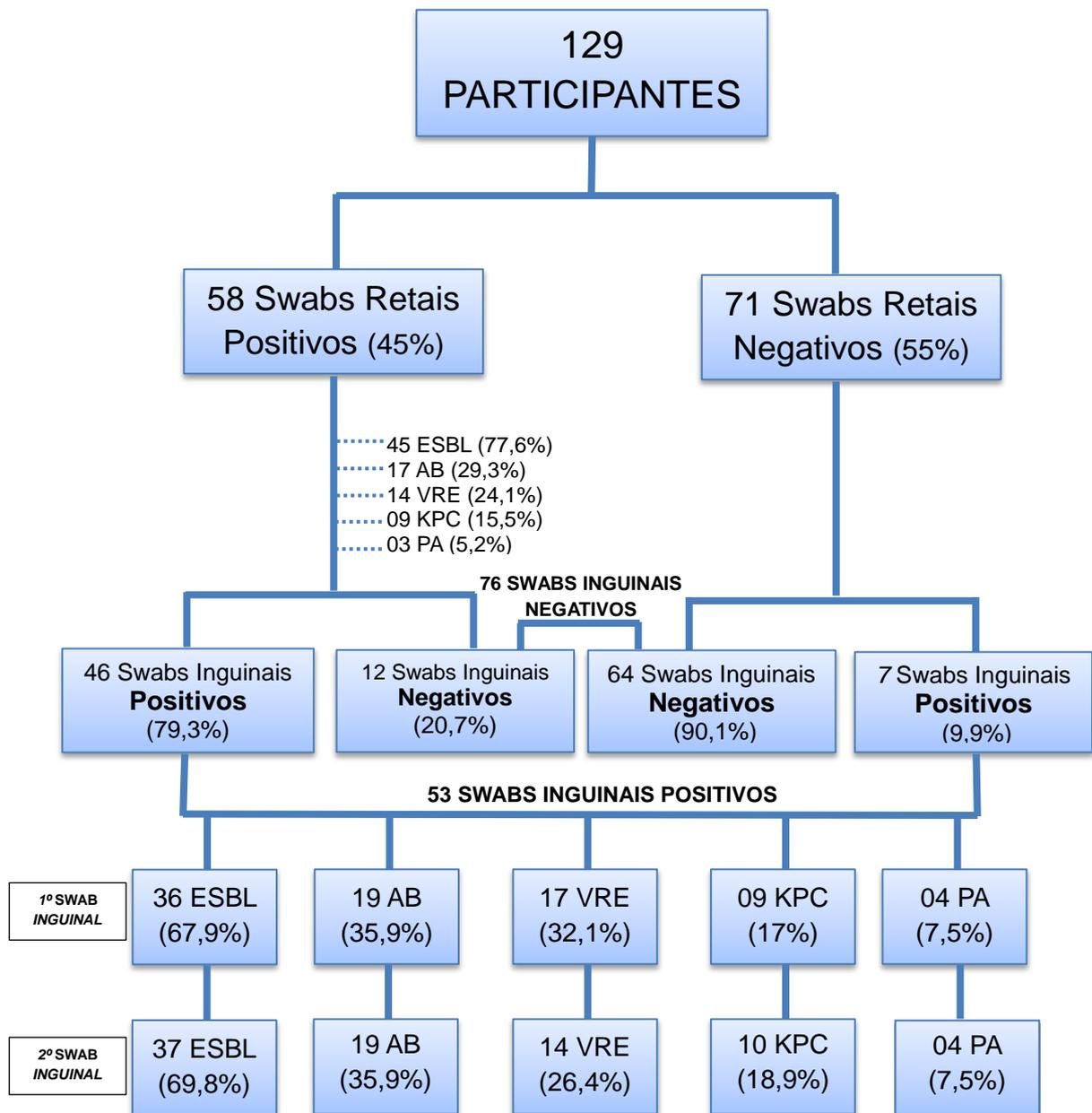


FIGURA 6 – FREQUÊNCIA DE SWABS RETAIS E INGUINAIS POSITIVOS E NEGATIVOS E PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES (N=129). CURITIBA, 2013.

Legenda: ESBL, Enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido; AB, *Acinetobacter baumannii*; VRE, *Enterococcus* resistente a vancomicina; KPC, Enterobactérias produtoras de carbapenemase; PA, *Pseudomonas aeruginosa*.

FONTE: A autora (2013).

O número total de participantes que apresentaram resultado de swab inguinal positivo foi de 53: 46 tiveram swab retal positivo e 7 swab retal negativo. Entre os 53 participantes com resultados de swabs inguinais positivos, a frequência com que os mesmos microrganismos foram isolados nas duas coletas inguinais esteve bastante próxima, evidenciando que a segunda coleta inguinal foi confirmatória da primeira, na maioria dos casos manteve-se a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL (Figura 6).

A *sensibilidade* do swab inguinal comparada ao swab retal foi de 79,3% (intervalo de confiança de 95% [CI], 68,9% a 89,7%); com isso, a margem de erro foi de 10,4% (diferença entre 79,3% e 68,9%). A especificidade foi de 90,1% (95% CI, 83,2% a 97,1%), com *Valor Preditivo Negativo* de 84,2% e *Valor Preditivo Positivo* de 86,8%. O *índice de acerto* foi de 85,3%.

Entretanto, dos 129 participantes da pesquisa, 27 participantes do Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) apresentaram uma particularidade que os diferenciou dos demais. Esta unidade adota por rotina o banho diário com clorexidina degermante a 2%; todos os demais serviços têm por rotina o uso de sabonete líquido ou em barra para o banho dos pacientes. Tal fato foi decisivo para apresentarmos os resultados em uma segunda versão, excluindo os referidos 27 participantes do TMO. Deste modo, a apresentação dos resultados a partir deste momento se refere a 102 participantes.

Dos 102 participantes selecionados para compor nossa amostra neste segundo momento da análise, encontramos 49 participantes que apresentaram swab retal positivo e 53 que tiveram swab retal negativo (Figura 7).

Dos 49 participantes com swab retal positivo para bactérias multirresistentes, 45 participantes também apresentaram swab inguinal positivo para bactérias multirresistentes, representando *sensibilidade* de 91,8% do swab inguinal quando comparado ao swab retal para detecção de bactérias multirresistentes (intervalo de confiança de 95% [CI], 84,2% a 99,5%). Com isso, a margem de erro passou a ser de 7,6% (diferença entre 91,8% e 84,2%).

Dos 53 participantes que tiveram swab retal negativo, 47 apresentaram swab inguinal negativo para bactérias multirresistentes, representando *especificidade* de 88,7% (intervalo de confiança de 95% [CI], 80,1% a 97,2%). O *valor preditivo negativo* foi de 92,2% e o *valor preditivo positivo* foi de 88,2% (Tabelas 5 e 6); o *índice de acerto* foi de 90,2%.

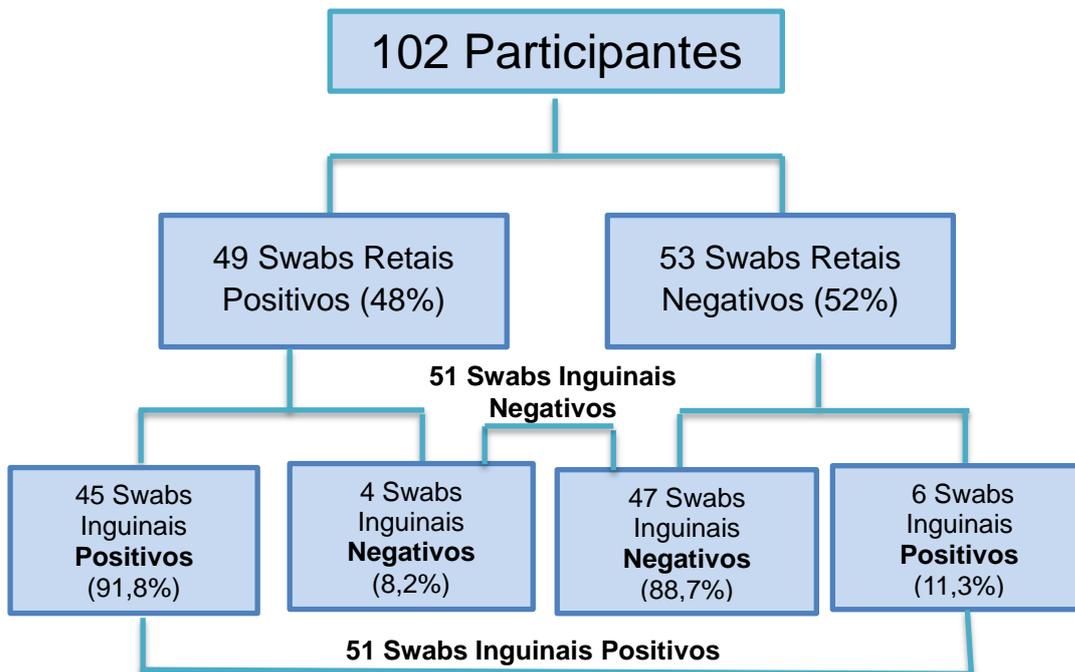


FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DE SWABS RETAIS E INGUINAIS POSITIVOS E NEGATIVOS (N=102). CURITIBA, 2013.
 FONTE: A autora (2013).

Os resultados de *sensibilidade*, *especificidade*, *valor preditivo positivo* e *valor preditivo negativo* estão apresentados na Tabelas 4, 5 e 6. Para elucidar a interferência dos 27 participantes da Unidade Transplante de Medula Óssea nos indicadores, estes foram incluídos na apresentação (Tabela 4). Na Tabela 6 estão apresentados os mesmos indicadores das Tabela 4 e 5, incluindo os intervalos de confiança dos índices de *sensibilidade* e *especificidade*. Nessas tabelas os participantes estão apresentados em quatro grupos: TMO, Geral sem TMO, Neonatal, UTI Adulto.

TABELA 5 – RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL, NA AMOSTRA TOTAL. CURITIBA, 2013.

GRUPO DE PACIENTES	SI + SR+	SI - SR -	SI + SR -	SI - SR +	T	SENS.	VPN	ESPEC.	VPP
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N	%	%	%	%
Geral	46 (35,7)	64 (49,6)	7 (5,4)	12 (9,3)	129	79,3	84,2	90,1	86,8
Geral Sem TMO	45 (44,1)	47 (46,1)	6 (5,9)	4 (3,9)	102	91,8	92,2	88,7	88,2
TMO	1 (3,7)	17 (63)	1 (3,7)	8 (29,6)	27	11,1	68	94,4	50

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; T, total; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo; GERAL, os 129 pacientes do estudo; TMO, transplante de medula óssea; GERAL sem TMO, os 129 pacientes do estudo sem os paciente do TMO.

FONTE: A autora (2013).

TABELA 6 – RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL, POR GRUPO DE PACIENTES (N=39). CURITIBA, 2013.

GRUPO DE PACIENTES	SI + SR+	SI - SR -	SI + SR -	SI - SR +	T	SENS.	VPN	ESPEC.	VPP
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N	%	%	%	%
Neonatal	6 (27,3)	14 (63,6)	1 (4,6)	1 (4,6)	22	85,7	93,3	93,3	85,7
UTI Adulto	12 (70,6)	3 (17,6)	2 (11,8)	0	17	100	100	60	85,7

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo; T, total, UTI, unidade de terapia intensiva.

FONTE: A autora (2013).

Ressalta-se que para os pacientes do TMO a *sensibilidade* do sítio inguinal comparado ao sítio retal foi de apenas 11,1%, e a especificidade, de 94,4%, diferentemente dos indicadores por grupo e geral sem TMO. Este resultado (Tabela 5) confirma a hipótese de interferência direta do uso da clorexidina degermante a 2% no banho diário destes pacientes na detecção de bactérias multirresistentes através de culturas de vigilância a partir do sítio inguinal. Ficou demonstrado, portanto que, para os pacientes do TMO, o sítio inguinal não é alternativa de coleta para culturas de vigilância em substituição ao sítio retal e, portanto, estendendo-se a outros serviços que adotem essa rotina.

Uma das propostas atuais na redução da disseminação de microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar tem sido o uso de soluções antissépticas de uso tópico, com a finalidade de redução da carga microbiana na pele dos pacientes

(OTTER *et al.*, 2012). A utilização do degermante antiséptico clorexidina a 2%, no banho de pacientes colonizados por microrganismos multirresistentes é uma estratégia de redução de colonização para alguns destes microrganismos, especialmente em pacientes que se encontram em unidades de terapia intensiva. Já havia sido demonstrado que esta medida foi efetiva na redução da concentração de *Enterococcus* resistente à Vancomicina (VRE) tanto na pele de pacientes submetidos a banhos diários com gluconato de clorexidina a 2%, como na redução nas mãos da equipe e em superfícies ambientais (VERNON *et al.*, 2006).

TABELA 7 – RESULTADOS DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL NA AMOSTRA TOTAL E POR GRUPO DE PACIENTES. CURITIBA, 2013.

GRUPO DE PACIENTES	SI +	SI -	SI +	SI -	TOTAL	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
	SR+	SR -	SR -	SR +			
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N	% (IC 95%)	% (IC 95%)
Geral	46 (35,7)	64 (49,6)	7 (5,4)	12 (9,3)	129	79,3 (68,9–89,7)	90,1 (83,2–97,1)
TMO	1 (3,7)	17 (63)	1 (3,7)	8 (29,6)	27	11,1 (0–31,6)	94,4 (83,9–100)
Geral (Sem TMO)	45 (44,1)	47 (46,1)	6 (5,9)	4 (3,9)	102	91,8 (84,2–99,5)	88,7 (80,1–97,2)
Neonatal	6 (27,3)	14 (63,6)	1 (4,6)	1 (4,6)	22	85,7 (59,8–100)	93,3 (80,7–100)
UTI Adulto	12 (70,6)	3 (17,6)	2 (11,8)	0	17	100 (100–100)	60 (17,1–102,9)

Legenda: SI, swab inguinal; SR, swab retal; IC, intervalo de confiança; GERAL, os 129 pacientes do estudo; TMO, transplante de medula óssea; Geral (Sem TMO), os 129 pacientes do estudo sem os paciente do TMO; Neonatal, pacientes menores de 1 ano, com uso de fraldas, totalmente dependente de cuidados, acamados, internados na UTI Neonatal ou UTI Pediátrica; UTI Adulto, Unidade de Terapia Intensiva Adulto, pacientes ocupando leitos na UTI-Adultos ou CTSI (Centro de Terapia Semi-intensiva).

FONTE: A autora (2013).

Esta prática também foi uma das medidas adotadas na redução de prevalência de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, durante um surto numa unidade de terapia intensiva. Para o banho, que normalmente é diário, foi utilizada clorexidina a 2% na forma líquida ou em toalhas impregnadas com esta substância, com o cuidado de não utilizá-la acima da linha da mandíbula ou diretamente em feridas cruentas. Salienta-se que o banho com clorexidina, quando instituído para uma determinada população de pacientes ou em determinada unidade de internação, deve ser utilizado para todos os pacientes, independentemente de estarem ou não colonizados por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos (CDC, 2012b).

Em recente estudo, foram confirmadas a efetividade deste antiséptico e sua tolerabilidade por pacientes no uso tópico (NISHIHARA *et al.*, 2012). O banho com clorexidina degermante também se mostrou efetivo na redução da incidência de *Clostridium difficile*, e embora a clorexidina não seja esporicida, acredita-se que a ação mecânica, através de fricção do antiséptico na pele durante o banho, tenha sido suficiente para reduzir esporos presentes na pele e, conseqüentemente, a redução na sua transmissão (RUPP *et al.*, 2012).

Os benefícios do banho diário com gluconato de clorexidina a 2%, na redução de aquisição de microrganismos multirresistentes, foram validados em estudo multicêntrico com aproximadamente 8 mil pacientes, sendo observado taxa de aquisição de microrganismos multirresistentes de 5,10 casos/1000 pacts-dia com banho de clorexidina a 2% *versus* 6,60 casos/1000 pacts-dia com banho com água e sabão ($p=0,03$), havendo redução na taxa de aquisição de VRE em 25%, sem evidência de aquisição de resistência ao antiséptico. A conclusão do estudo foi que o banho diário com clorexidina reduziu significativamente os riscos de aquisição de microrganismos multirresistentes (CLIMO, 2013). A utilização de clorexidina degermante a 2% no banho diário de pacientes colonizados, especialmente por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, é uma estratégia que deve ser considerada na prevenção de transmissão cruzada de microrganismos multirresistentes, principalmente em pacientes críticos e de alto risco de aquisição destes patógenos.

Um estudo realizado num LTACH (*long-term acute care hospitals*), nos Estados Unidos, para determinar o efeito da implementação de um *bundle* de intervenções de controle de infecção na transmissão horizontal de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase durante um surto, utilizou as seguintes medidas: banho diário com gluconato de clorexidina 2%; melhoria na limpeza do ambiente; coleta de culturas de vigilância à admissão; estudos de prevalência seriados; precauções de contato e treinamento da equipe. A prevalência pré-intervenção foi de 21% de colonização com isolados produtores de KPC (8 de 39 pacientes submetidos a *screening*); após a intervenção as taxas de colonização mensais foram progressivamente menores, com índices de 12%, 5%, 3%, 0% e 0% ($p < 0,001$) (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2010).

Pesquisadores suíços, apontaram a pele da região inguinal como importante sítio de colonização por enterobactérias produtoras de ESBL, e sugerem que

tentativas de descolonização voltadas para estes patógenos no futuro, devem incluir a utilização de sabões antisépticos para o tratamento da pele colonizada (BUEHLMANN *et al.*, 2010).

Os índices reduzidos de *sensibilidade* e elevados de *especificidade* (11,1% e 94,4%, respectivamente) para o sítio inguinal que encontramos no grupo de participantes do TMO nesta pesquisa nos permitem dizer que, para estes pacientes, o sítio inguinal não é alternativa adequada para coleta das culturas de vigilância. Os resultados sugerem também evidência na interferência da clorexidina 2% degermante utilizada no banho diário deste grupo de pacientes, podendo servir como um fator de proteção para impedir que a pele da região inguinal destes pacientes, permaneça colonizada por bactérias multirresistentes.

O resultado do grupo de participantes constituído pela Unidade de Terapia Intensiva Adultos, apresentou resultado oposto ao do grupo do TMO, com índices de *sensibilidade* e *valor preditivo negativo* de 100% para o sítio inguinal. Ao considerarmos que neste grupo de pacientes também foram identificados fatores de risco que apresentaram correlação com os resultados elevados de sensibilidade, tais como, estarem acamados (97,1%), uso de sonda vesical de demora (100%) e uso de fraldas (97,5%), incontinência fecal (91,7%) e diarreia (100%), podemos sugerir que a substituição do sabonete líquido sem antiséptico, por degermante à base de clorexidina 2%, é uma importante estratégia de prevenção de disseminação de patógenos multirresistentes.

Entendemos que o banho diário com clorexidina 2% degermante reduzirá a colonização cutânea destes pacientes e, conseqüentemente, a chance de transmissão cruzada entre pacientes, de patógenos multirresistentes ou através das mãos da equipe assistencial, durante os inúmeros manuseios exigidos por estes pacientes, conforme já evidenciado por Vernon e colaboradores (2006) e Evans e colaboradores (2010) ao demonstrarem a redução da transmissão horizontal de VRE, MRSA e *Acinetobacter* spp. em UTI. Os resultados desta pesquisa sugerem ainda, que este grupo de pacientes também será beneficiado pela coleta de culturas de vigilância através do sítio inguinal, uma vez que os resultados de *sensibilidade* e *valor preditivo negativo* para este grupo de pacientes foi de 100%, conforme mencionado.

O resultado encontrado para o grupo Neonatal, composto por 22 participantes, mostrou *sensibilidade* de 85,7%, inferior à sensibilidade do grupo geral

que foi de 91,8%. Mesmo com esta diferença de 6,1% na *sensibilidade* encontrada para este grupo, a coleta de sítio inguinal permitiu a detecção de bactérias multirresistentes em grande parte destes participantes, reiterando ser considerada alternativa para a coleta de culturas de vigilância como resultados de estudos. (WEINTROB *et al.*, 2010; BUEHLMANN, *et al.*, 2010; HAASE, *et al.*, 2013).

5.3 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS E FATORES DE INTERFERÊNCIA PARA A COLONIZAÇÃO

A partir das informações das fichas individuais de coleta, apresentamos a seguir os resultados de swabs inguinais comparados aos swabs retais segundo variáveis demográficas e possíveis fatores de interferência na colonização do paciente por bactérias multirresistentes (Tabelas 8, 9, e 10).

TABELA 8 – INTERFERÊNCIA DO GÊNERO E DA MOBILIDADE DOS PARTICIPANTES NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DOS RESULTADOS DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102). CURITIBA, 2013.

FATORES DE INTERFERÊNCIA	SI +	SI -	SI +	SI -	TOTAL	SENS.	VPN	ESPEC.	VPP
	SR+	SR -	SR -	SR +					
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	%	%	%	%
Gênero									
Feminino	26 (45,6)	25 (43,9)	4 (7)	2 (3,5)	57 (55,9)	92,9	92,6	86,2	86,7
Masculino	19 (42,2)	22 (48,9)	2 (4,4)	2 (4,4)	45 (44,1)	90,5	91,7	91,7	90,5
Mobilidade									
Acamado	34 (50,8)	27 (40,3)	5 (7,5)	1 (1,5)	67 (65,7)	97,1	96,4	84,4	87,2
Deambulando	11 (31,4)	20 (57,1)	1 (2,9)	3 (8,6)	35 (34,3)	78,6	87	95,2	91,7

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo.

FONTE: A autora (2013).

A *sensibilidade* e a *especificidade* da coleta inguinal, em comparação à coleta retal, nos participantes divididos por gênero, foram elevadas em ambos, e os resultados sugerem que o gênero não interferiu nos resultados, de acordo com os dados da Tabela 8.

No fator imobilidade, quando observadas a *sensibilidade* e a *especificidade* do sítio inguinal em comparação ao retal para a detecção de bactérias

multirresistentes, esses indicadores foram de 97,1% e 84,4%, respectivamente, com VPN de 96,4% e VPP de 87,2% (Tabela 8); e a acurácia foi de 91%. Esses resultados foram superiores em relação aos pacientes que deambulam, cuja acurácia foi de 88,6%. Os resultados mostram que pacientes acamados estão mais propícios a apresentar a região inguinal colonizada por bactérias multirresistentes, refletindo a presença destes patógenos no trato intestinal. Existe forte sugestão de que as coletas inguinais possam substituir as coletas retais no grupo de pacientes acamados.

A presença de sonda vesical de demora foi observada na maioria (74,2%) dos participantes que apresentaram resultado positivo, tanto no swab retal quanto no inguinal, isto é, em 23 participantes. A sensibilidade do sítio inguinal relacionado ao retal foi de 100%, com VPN de 100% (Tabela 9). Este resultado sugere com forte evidência, que a presença deste dispositivo pode ser um fator de risco associado à colonização inguinal em pacientes previamente colonizados no trato intestinal, refletindo a gravidade deste grupo de pacientes e seu manuseio mais frequente nos cuidados assistenciais.

Considerando os resultados que encontramos referentes ao grupo de participantes em uso de sonda vesical de demora, como provável fator de risco para colonização inguinal, com sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%, consideramos importante reforçar a importância da avaliação diária quanto à real necessidade deste dispositivo, pois além de contribuir para aumentar o risco de infecção do trato urinário (CDC, 2009b; GOULD, *et al.*, 2010) pode aumentar o risco de colonização por patógenos multirresistentes.

TABELA 9 – INTERFERÊNCIA DA INCONTINÊNCIA URINÁRIA E USO DE SONDA VESICAL DE DEMORA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102). CURITIBA, 2013.

FATORES DE INTERFERÊNCIA	SI + SR+	SI - SR -	SI + SR -	SI - SR +	TOTAL	SEN.	VPN	ESPEC	VPP
A	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	%	%	%	%
Incontinência Urinária									
Sim	8 (30,8)	16 (61,5)	1 (3,8)	1 (3,8)	26 (25,5)	88,9	94,1	94,1	88,9
Não	37 (48,7)	31 (40,8)	5 (6,6)	3 (4)	76 (74,5)	92,5	91,2	86,1	88,9
Uso de SVD									
Sim	23 (74,2)	6 (19,4)	2 (6,5)	0	31 (30,4)	100	100	75	92
Não	22 (31)	41 (57,8)	4 (5,6)	4 (5,6)	71 (69,6)	84,6	91,1	91,1	84,6

Legenda: Sen., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo, SVD, sonda vesical de demora.

FONTE: A autora (2013).

A incontinência urinária não parece interferir na colonização cutânea em pacientes colonizados em trato intestinal. Nesse grupo de participantes a *sensibilidade* do sítio inguinal comparada ao sítio retal foi de 88,9%, com VPN de 94,1%. A *sensibilidade* entre os participantes sem incontinência urinária foi maior, talvez por não exigir maior frequência de higiene perineal quando comparados ao grupo de incontinentes.

A presença de fraldas parece ser também um fator a influenciar que pacientes colonizados em trato intestinal também apresentem a pele da região inguinal colonizada, uma vez que a *sensibilidade* do sítio inguinal, quando relacionada ao retal, foi de 97,5%, com VPN de 96,3% e VPP de 90,7%. Dos 40 participantes s em uso de fraldas que apresentaram swab retal positivo, 39 apresentaram swabs inguinais positivos, e a *especificidade* foi de 86,7%. Entre os participantes que não utilizaram fraldas, a *sensibilidade* foi de 66,7% (Tabela 10).

Pacientes com incontinência fecal parecem ter grande probabilidade de colonização inguinal, em decorrência da colonização intestinal. Houve 91,7% de *sensibilidade* do sítio inguinal para detecção de bactérias multirresistentes quando o sítio retal se encontrava colonizado, com VPN de 93,8% (Tabela 9). Porém, pacientes com incontinência fecal não parecem apresentar maior probabilidade de colonização do sítio inguinal em comparação ao sítio retal, uma vez que os resultados de *sensibilidade* e *especificidade* e VPN foram semelhantes.

TABELA 10 – INTERFERÊNCIA DO USO DE FRALDAS, PRESENÇA DE INCONTINÊNCIA FECAL E DIARRÉIA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL (N=102). CURITIBA, 2013.

FATORES DE INTERFERÊNCIA	SI + SR+	SI - SR -	SI + SR -	SI - SR +	TOTAL	SENS.	VPN	ESPEC.	VPP
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N (%)	%	%	%	%
Uso de Fraldas									
Sim	39(55,7)	26(37,1)	4(5,7)	1(1,4)	70(68,6)	97,5	96,3	86,7	90,7
Não	6(18,8)	21(65,5)	2(6,3)	3(9,4)	32(31,4)	66,7	87,5	91,3	75
Incontinência Fecal									
Sim	11(50)	15(68,2)	2(9,1)	1(4,5)	22(21,6)	91,7	93,8	88,2	84,6
Não	34(42,5)	32(40)	4(5)	3(3,8)	80(78,4)	91,9	91,4	88,9	89,5
Diarréia									
Sim	11(64,7)	6(35,3)	2(11,8)	0	17(16,7)	100	100	66,7	84,6
Não	34(40)	43(50,6)	4(4,7)	4(4,7)	85(83,3)	89,5	91,5	91,5	89,5

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo.

FONTE: A autora (2013).

Existe forte sugestão de que pacientes com diarreia influenciaram diretamente a colonização inguinal a partir da colonização retal, pois houve 100% de *sensibilidade* no sítio inguinal no grupo avaliado, com VPN de 100%. Dos 17 participantes que apresentavam diarreia, 11 tinham swab retal e inguinal positivos. No grupo de pacientes sem diarreia, a sensibilidade do swab inguinal em comparação ao sítio retal foi de 89,5% (Tabela 10).

5.4 RESULTADOS DOS SWABS INGUINAIS E RETAIS POR MICRORGANISMO

Para esta análise, em relação aos resultados da coleta inguinal, foram considerados positivos para a bactéria os casos que tiveram positividade nas duas coletas inguinais. Da mesma forma, foram considerados negativos aqueles que tiveram resultado negativo em pelo menos uma das coletas inguinais. Isto equivale dizer que, para *Acinetobacter baumannii* foram excluídos 7 participantes; para enterobactérias produtoras de ESBL, 10 participantes; para enterobactérias produtoras de KPC, um participante; para *Pseudomonas aeruginosa*, um participante; e para o VRE, 8 participantes.

A *sensibilidade* do swab inguinal em relação ao swab retal para a detecção de *Acinetobacter baumannii* foi de 85,7%, com VPN de 97,5%. A *especificidade* foi de 94%, com VPP de 70,6%. Na maioria dos casos (90%) a contagem de colônias recuperada na região inguinal foi superior a 100 colônias, enquanto esta mesma contagem de colônias esteve presente em 60% dos isolados de swab retal (Tabela 11).

TABELA 11 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO DO SWAB INGUINAL COMPARADO AO SWAB RETAL CONSIDERANDO AS DIFERENTES BACTÉRIAS ISOLADAS. CURITIBA, 2013.

MICROORGANISMO	SI +	SI -	SI +	SI -	T	SENS.	VPN	ESPEC.	VPP
	SR+	SR -	SR -	SR +					
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	%	%	%	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	79	5	2	98	85,7	97,5	94	70,6
Enterobactérias ESBL	29	60	4	6	99	82,9	90,9	93,8	87,9
Enterobactérias KPC	8	92	0	1	101	88,9	98,9	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	95	0	1	98	66,7	99	100	100
VRE	7	82	6	2	97	77,8	97,6	93,2	53,8

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; ESBL, beta-lactamase de espectro estendido; KPC, produtora de carbapenemase; VRE, *Enterococcus* resistente a vancomicina; SI, swab inguinal; SR, swab retal; T, total; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo positivo.

FONTE: A autora (2013).

O sítio inguinal apresentou *sensibilidade* de 82,9% na detecção de enterobactérias produtoras de ESBL, com VPN de 90,9% e *especificidade* de 93,8%, com VPP de 87,9%. A grande maioria das culturas (81,5%) de sítio inguinal apresentou acima de 100 colônias isoladas e, destas, pouco mais da metade também apresentaram esta contagem em sítio retal (Tabelas 11 e 12).

Para a detecção de enterobactérias produtoras de KPC, a *sensibilidade* foi de 88,9%, com VPN de 98,9%, sendo a *especificidade* e o VPP de 100%. Também a maioria (75%) das culturas inguinais detectou quantidade superior a 100 colônias (Tabelas 11 e 12).

Para a detecção de *Pseudomonas aeruginosa*, o sítio inguinal apresentou *sensibilidade* de apenas 66,7%, com VPN de 99%. É importante mencionar que apenas três culturas foram positivas para este patógeno, havendo possibilidade de que os resultados encontrados para *sensibilidade* e *especificidade* pudessem ser diferentes para uma amostra maior.

Para o VRE foi encontrada *sensibilidade* no sítio inguinal de 77,8% (7 positivos em 9 coletas), com VPN de 97,6% e *especificidade* de 93,2%. Também na maioria (85,7%) das culturas de sítio inguinal, foram isoladas acima de 100 colônias do patógeno mencionado.

Na grande maioria dos casos, houve alta contagem de colônias tanto no sítio retal quanto no inguinal, evidenciando a proximidade desses dois sítios anatômicos no isolamento das bactérias em estudo. Percebe-se, também, que, para todos os patógenos isolados em sítio inguinal, houve, na maioria dos isolados, contagem superior a 100 colônias. Outra constatação é que, mesmo na presença de baixa contagem de colônias em sítio retal, houve alta contagem em sítio inguinal, reforçando a importância da higiene corporal do paciente e da adoção de precauções padrão no contato com a região perineal durante a assistência hospitalar. Embora Lautenbach e colaboradores (2005) tenham encontrado resultados de swab retal e peri-retal falso-negativos quando a concentração deste patógeno nas fezes era muito baixa, isto é, menor do que cinco colônias por placa, em nossa pesquisa pudemos evidenciar a *sensibilidade* do sítio inguinal em comparação ao sítio retal também quando a contagem de colônias isolada foi analisada.

TABELA 12 – FREQUÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM SÍTIO INGUINAL E RETAL. CURITIBA, 2013.

MICROORGANISMOS	N	> 100 COLÔNIAS EM SI E SR	< 100 COLÔNIAS EM SI E SR	< 100 COLÔNIAS EM SI; > 100 COLÔNIAS EM SR	> 100 COLÔNIAS EM SI; < 100 COLÔNIAS EM SR
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	3	1	0	6
Enterobactérias ESBL	27	14	2	3	8
Enterobactérias KPC	8	4	0	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	0	2
VRE	7	3	0	1	3

Legenda: Sens., Sensibilidade; Espec., Especificidade; SI, swab inguinal; SR, swab retal; >, superior a; <, inferior a; ESBL, beta-lactamase de espectro estendido; KPC, produtoras de carbapenemase; VRE, *Enterococcus* resistente a vancomicina.

FONTE: A autora (2013).

Embora a cultura de amostra de fezes seja considerada padrão-ouro ou *gold standard* na identificação de colonização do trato gastrointestinal por microrganismos multirresistentes, particularmente para bacilos gram-negativos, este exame é considerado impraticável na rotina de coleta de culturas de vigilância

(LAUTENBACH *et al.*, 2005). Como alternativa, foram propostas e validadas as coletas de swabs retais e peri-retais para detecção de bactérias multirresistentes (WEINSTEIN *et al.*, 1996; MUTO *et al.*, 2003; LAUTENBACH *et al.*, 2005), sendo esta prática, atualmente, seguida pela maior parte das instituições de saúde que adotam a realização de culturas de vigilância em seus protocolos de controle de patógenos multirresistentes.

Considerando, muitas vezes, as dificuldades na realização das coletas de swab retal, devido às suas particularidades, e considerando a proximidade dos tratos intestinal e cutâneo na região inguinal, pressupomos a possibilidade de haver colonização cutânea por bactérias multirresistentes de origem intestinal e também devido ao calor e umidade naturais deste sítio anatômico. Assim, nos propusemos a avaliar a sensibilidade e a especificidade do sítio inguinal comparado ao sítio retal, sendo este considerado o *gold standard*. Conforme dito por Weinstein e colaboradores (1996), se a *sensibilidade* das culturas de vigilância é alta, então a maioria dos pacientes colonizados será identificada, e as medidas de controle terão maior probabilidade de serem efetivas, ao mesmo tempo; se a *sensibilidade* for baixa, teremos vários pacientes falso-negativos, e a prevalência de colonização será subestimada. Estes autores foram os pioneiros em definir a *sensibilidade* dos sítios retais e peri-retais na detecção de VRE, ainda na década de 1990, quando VRE era o patógeno emergente nas instituições de saúde e o maior motivo de preocupação. Os resultados encontrados referentes à *sensibilidade* foram equivalentes para os dois sítios, afirmando que ambos eram métodos igualmente sensíveis para a detecção de VRE (WEINSTEIN *et al.*, 1996).

Os resultados da presente pesquisa mostraram *sensibilidade* do sítio inguinal em relação ao sítio retal para a detecção de VRE, de 77,8%, com *valor preditivo negativo* de 97,6% e *especificidade* de 93,2%, comparáveis aos encontrados por Weinstein e colaboradores (1996), um dos primeiros pesquisadores a avaliar a *sensibilidade* do sítio retal na detecção de VRE, cujos resultados para *sensibilidade* foram de 79%, com valor preditivo negativo de 83,3% e *especificidade* de 87%, para o sítio retal em comparação ao exame de cultura de fezes, considerado padrão-ouro (Tabela 13).

TABELA 13 - RESULTADOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDITIVO NEGATIVO DE SWAB INGUINAL E RETAL PARA DIFERENTES MICRORGANISMOS SEGUNDO ALGUNS PESQUISADORES. CURITIBA, 2013.

MICRORGANISMO ISOLADO	SENSIBILIDADE	VPN	ESPECIFICIDADE	PESQUISADORES
VRE	77,8% (SI)	97,6%	93,2%	STIER, 2013
	79% (SR)	83,3%	87,0%	WEISTEIN <i>et al.</i> , 1996
<i>Acinetobacter baumannii</i>	85,7%(SI)	97,5%	94%	STIER, 2013
	73% (SI)	97%	-	WEINTROB <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterobacterias ESBL</i>	82,9% (SI)	90,9%	93,8%	STIER, 2013
	73% (SI)	-	-	BUEHLMANN <i>et al.</i> , 2010
<i>E. coli</i> ESBL	71% (SI)	98%	-	WEINTROB <i>et al.</i> , 2010
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	100% (SI)	100%	-	WEINTROB <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterobactérias KPC</i>	88,9% (SI)	98,9%	100%	STIER, 2013
	79% (SI)	-	-	THURLOW <i>et al.</i> , 2013
	88% (SR)	-	-	THURLOW <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ESBL, beta-lactamase de espectro estendido; KPC, produtora de carbapenemase; VRE, *Enterococcus* resistente a vancomicina; SI, swab inguinal; SR, swab retal; VPN, valor preditivo negativo.

FONTE: A autora (2013).

O sítio inguinal já havia sido avaliado em outros três estudos, mostrando *sensibilidades* variadas para alguns microrganismos multirresistentes, tais como o complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, enterobactérias produtoras de ESBL, particularmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e enterobactérias produtoras de KPC (WEINTROB *et al.*, 2010; BUEHLMANN, *et al.*, 2010; THURLOW, *et al.*, 2013). Estes estudos encontraram índices de *sensibilidade* que variaram de 73% a 100%, dependendo do microrganismo avaliado. A *sensibilidade* do sítio inguinal na detecção de *Acinetobacter baumannii* encontrada na presente pesquisa foi de 85,7%, com *valor preditivo negativo* de 97,5%, superior àquele encontrado por Weintrob e colaboradores (2010) para este patógeno, cuja *sensibilidade* foi de 73% e *valor preditivo negativo* de 97%. Ao avaliarmos a

sensibilidade do sítio inguinal quanto à possibilidade de detecção de enterobactérias produtoras de ESBL, encontramos resultado de 82,9%, com *valor preditivo negativo* de 90,2%, comparáveis aos resultados de Weintrob e colaboradores (2010) e Buehlmann e colaboradores (2010). Buehlmann *et al.* (2010), como em nossa pesquisa, também analisaram as várias enterobactérias agrupadas, tendo encontrado *sensibilidade* no sítio inguinal de 73%. Para Weintrob e colaboradores (2010), que avaliaram separadamente *Escherichia coli* ESBL e *Klebsiella pneumoniae* ESBL, a *sensibilidade* encontrada foi de 71% e 100%, respectivamente.

Contudo, acreditamos que um dos resultados mais importantes da presente pesquisa refere-se aos valores de *sensibilidade* e *especificidade* encontrados na detecção de enterobactérias produtoras de KPC, sendo de 88,9% e 100%, respectivamente. Estes achados são comparáveis aos de Thurlow e colaboradores (2013), que avaliaram diversos sítios anatômicos quanto à possibilidade de detecção dessas enterobactérias, e concluíram que o sítio retal foi o sítio único mais sensível, com 88% de *sensibilidade*, seguido do sítio inguinal, com 79% de *sensibilidade*. Os autores avaliaram a combinação dos dois sítios de maior *sensibilidade* (retal e inguinal) e concluíram que o *screening* inguinal e retal juntos detectaram todos os pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC, o que nos permite também dizer que, se combinarmos as coletas destes dois sítios, estaremos aumentando a *sensibilidade* na detecção de enterobactérias produtoras de KPC para 100%. Ao considerarmos que estamos em busca de um método que seja tão sensível quanto a cultura de fezes na detecção de bactérias multirresistentes de colonização intestinal, neste caso com 100% de *sensibilidade* e *especificidade*, os resultados desta pesquisa, assim como os dos estudos já mencionados, parecem conduzir para esta perspectiva, ao nos referirmos às enterobactérias produtoras de KPC como patógenos emergentes da atualidade, que representam um dos maiores desafios em busca da qualidade de assistência.

Uma vez que coletas de culturas de vigilância realizadas, a partir do sítio retal e peri-retal, não possuem *sensibilidade* de 100%, as mesmas podem falhar na detecção de colonização por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos à admissão e durante a sua hospitalização, representando importante reservatório e fonte de disseminação destes patógenos (LEWIS, 2013). Assim sendo, considerando que a *sensibilidade* foi de 90% no sítio inguinal comparado ao sítio retal na pesquisa de enterobactérias produtoras de KPC, se combinarmos os dois

sítios de coleta, retal e inguinal, poderemos potencializar a detecção deste patógeno. Resultado semelhante foi encontrado por Thurlow e colaboradores (2013), os quais concluíram que o *screening* inguinal e o retal juntos detectaram todos os pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC.

Da mesma forma que Thurlow e colaboradores (2013), concluímos que a realização de culturas de vigilância de múltiplos sítios anatômicos pode ser importante estratégia para otimizar a detecção de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes. Considerando que o *screening* retal pode resultar em falso-negativos, se levarmos em conta que encontramos no presente estudo *sensibilidade* de 91,8% no *screening* inguinal para a detecção de bactérias multirresistentes e, se combinarmos estes dois sítios de coleta, na rotina institucional, utilizando o mesmo swab para os dois sítios, poderemos aumentar a possibilidade de detecção de pacientes colonizados e, assim, a positividade das culturas de vigilância. Esta rotina é preconizada no Hospital das Clínicas de São Paulo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, 2012).

A realização de culturas de vigilância como medida necessária para a prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes no ambiente hospitalar continua sendo defendida com ênfase por grande parte dos estudiosos, sobretudo em razão da atual emergência de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos no cenário mundial (BEN-DAVID *et al.*, 2010; SCHWABER *et al.*, 2011; CHITNIS *et al.*, 2012; SANDORA, *et al.*, 2013). Para Backman e colaboradores (2011), existe evidência de que a utilização de múltiplas intervenções reduz as taxas de microrganismos multirresistentes nas instituições de saúde. Após revisão integrativa que incluiu 1.382 artigos, sendo selecionados 32 deles, os autores afirmam que, apesar de ainda não estar claro quais são os *bundles* ou pacotes de intervenções que são efetivas, existe clara sugestão de que múltiplas e simultâneas intervenções possam ser efetivas na redução de infecções por microrganismos multirresistentes. Ainda, que muitos estudos demonstraram que a adoção de culturas de vigilância esteja associada à redução de infecções por microrganismos multirresistentes.

Indiscutivelmente, a correta higienização das mãos e a adoção de precauções padrão nos cuidados assistenciais aos pacientes continuam sendo as principais medidas de prevenção na transmissão de patógenos multirresistentes, sendo preconizadas universalmente (SIEGEL *et al.*, 2007). Apesar de serem

consideradas medidas básicas de prevenção na transmissão cruzada de patógenos, são ao mesmo tempo essenciais para atingir este objetivo. Contudo, constituem uns dos maiores desafios aos profissionais diretamente envolvidos em coordenar e implantar os programas de controle de infecção no ambiente hospitalar. Alcançar a meta de 100% de adesão à higienização de mãos, no rigor da técnica, por parte dos profissionais que prestam cuidados de saúde, em 100% das oportunidades, como preconiza a OMS (WHO, 2006), combinada às precauções padrão, deve ser a busca permanente (MATHAI *et al.*, 2010). Contudo, apesar da incontestável importância, infelizmente inúmeros são os relatos evidenciando índices reduzidos de adesão à higienização das mãos (SANTANA *et al.*, 2007; NORITOMI *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2006). Assim sendo, a transmissão cruzada de patógenos multirresistentes através das mãos da equipe assistencial continua sendo uma realidade constante. Neste contexto, a aquisição destes patógenos durante a hospitalização, manifestada na forma de colonização ou infecção, ocorrerá para alguns pacientes, em maior ou menor proporção.

A coleta de culturas de vigilância é importante ferramenta para que pacientes colonizados sejam identificados com a maior precocidade possível, e para que os cuidados possam ser implementados (LANDELLE; PAGANI; HARBARTH, 2013), evitando assim a exposição desnecessária de novos pacientes (SANTOS; MAYO; SIEGEL, 2008). Para nosso entendimento, conhecer a prevalência de patógenos multirresistentes no âmbito hospitalar e identificar precocemente patógenos emergentes que apresentem novos mecanismos de resistência, evitando que se tornem rapidamente endêmicos na instituição, assim permitindo que mais e mais pacientes sejam expostos, é uma importante intervenção de saúde pública. Todos os esforços devem ser realizados para impedir que aqueles que se tornam temporariamente pacientes, em busca da cura de suas enfermidades, sejam impedidos de alcançá-la, por terem adquirido microrganismos multirresistentes.

Há consenso na literatura de que um programa de controle de microrganismos multirresistentes deverá adotar, por rotina, a coleta de culturas de vigilância na admissão de pacientes com história pregressa que possa representar risco de colonização, e para aqueles pacientes com maior vulnerabilidade. Com base nos resultados desta pesquisa, poderá ser construído um algoritmo para pontuar os fatores de risco para a colonização por bactérias multirresistentes; seu resultado pode contribuir para a adoção precoce de medidas de prevenção e

controle. Proposta semelhante foi feita por Luvsansharav e colaboradores (2013) que consideraram os seguintes fatores de risco para aquisição de enterobactérias produtoras de ESBL, em população residente em *nursing homes*: residentes que possuíam o maior nível de cuidado; acamados; em uso de fraldas; diabetes; infecção do trato urinário; história de hospitalização, e procedimentos invasivos no último ano. Traçando um paralelo com a nossa pesquisa, encontramos como fatores de risco para colonização, com significância estatística, pacientes acamados; em uso de fraldas; em uso de sonda vesical de demora; além da idade e presença de diarreia.

Os resultados do presente estudo mostraram que muitos dos pacientes colonizados retornarão à comunidade nessa condição, podendo contribuir para alterar a microbiota comunitária, por ora distinta da microbiota hospitalar. E, por sua vez, alguns destes pacientes serão novamente hospitalizados, colocando sob risco outros pacientes, aumentando a pressão de colonização no ambiente hospitalar.

Assim, a realização de culturas de vigilância constitui ferramenta importante para minimizar esta problemática que representa, atualmente, um dos mais graves problemas a atingir a humanidade – a resistência bacteriana, referida por Trench (2012) como um “Desastre Ecológico Microbiológico”.

6 CONCLUSÕES

Considerando, muitas vezes, as dificuldades na realização das coletas de swab retal, devido às suas particularidades, e considerando a proximidade dos tratos intestinal e cutâneo na região inguinal, acrescidos de calor e umidade naturais deste sítio anatômico, esta pesquisa teve por hipótese a existência de colonização cutânea por bactérias multirresistentes de origem intestinal, neste sítio anatômico. Deste modo, foi objetivo desta pesquisa avaliar a sensibilidade e especificidade do sítio inguinal comparado ao sítio retal, sendo este considerado o padrão-ouro.

Os resultados demonstraram que o sítio inguinal apresentou 91,8% de sensibilidade e 88,7% de especificidade quando comparado ao swab retal na detecção de bactérias multirresistentes, na rotina de coleta de culturas de vigilância. Entre os pacientes de unidade de terapia intensiva, a sensibilidade foi de 100% e, entre os isolados, destacam-se a alta *sensibilidade* e o *valor preditivo negativo* de enterobactérias produtoras de carbapenemases e *Acinetobacter baumannii*. Deste modo, o sítio inguinal pode ser considerado alternativa segura para a coleta de culturas de vigilância para bactérias multirresistentes de colonização intestinal.

De acordo com os resultados desta pesquisa, em pacientes que utilizam a clorexidina degermante 2% para o banho diário, o sítio inguinal não pode ser utilizado para a coleta de culturas de vigilância, nos quais a sensibilidade foi de 11,1% e especificidade de 94,4%, índices esses atribuídos à interferência direta deste anti-séptico na redução da microbiota cutânea.

A contagem de colônias no sítio inguinal foi alta e superior, em frequência, ao sítio retal, salientando a importância da higiene desta região e da adoção de precauções padrão durante a assistência em saúde.

A colonização foi associada ao óbito como desfecho. Foram identificados como fatores de interferência, estatisticamente significativos, para a colonização por bactérias multirresistentes de colonização intestinal, a idade, a mobilidade, o uso de sonda vesical de demora e de fralda e diarreia. Esses fatores estiveram associados à maior sensibilidade e fator preditivo negativo, à exceção da idade.

Concluimos, portanto, que os swabs inguinais representam técnica sensível, específica e de fácil execução na rotina institucional para a pesquisa de microrganismos multirresistentes, à exceção de pacientes higienizados

rotineiramente com clorexidina degermante. Os resultados podem contribuir para a discussão acerca do sítio ideal de coleta e, possivelmente, para a adoção da coleta inguinal como alternativa nos protocolos de culturas de vigilância.

Consideramos como limitação desta pesquisa a redução dos participantes, visto que, de uma amostra de 150 participantes, tivemos nesta pesquisa 102, em razão dos critérios de exclusão adotados para atender ao rigor metodológico necessário à pesquisa realizada.

Um último aspecto que não poderíamos deixar de abordar, se refere à reação manifestada por grande parte dos participantes, durante o período de coletas das amostras de swab retal e inguinal. Nesta pesquisa, tivemos a oportunidade de conversar com diversos participantes a respeito de sua percepção relativa às duas técnicas de coleta realizadas. Esses foram unânimes em afirmar que a coleta inguinal tem melhor aceitabilidade e é mais fácil de ser realizada. Esta foi também nossa percepção como coletadora dos exames, nas duas técnicas empregadas, integrando a percepção de outros pesquisadores que mostraram ter a coleta de swab peri-retal, quando comparada à coleta retal, maior aceitabilidade pelos pacientes. Acreditamos que a substituição do swab retal por swab inguinal possa trazer ainda maior aceitabilidade na realização das coletas de culturas de vigilância.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v.146, n.4, p.837, 1940.
- ADAM, R. Skin care of the diaper area. **Pediatr Dermatol.**, v.25, n.4, p.427-433, 2008.
- AGODI, A. *et al.* Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **J Clin Microbiol.**, v.49, n.11, p.3986-3989, 2011.
- AKIN, F. *et al.* Effects of breathable disposable diapers: reduced prevalence of *Candida* and common diaper dermatitis. **Pediatr Dermatol.**, v.18, p.282-290, 2001.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v.289, n.1036, p.321-331, 1980.
- ANDERSSON, H. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in residents of nursing homes in a Swedish municipality: healthcare staff knowledge of and adherence to principles of basic infection prevention. **Scand J Infect Dis.**, v.44, n.9, p.641-649, 2012.
- ANDRADE, S.S. *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2003-2008). **Bras J Infec Dis.** v.12, p.3-9, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – principais grupos disponíveis para uso clínico: Quinolonas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas.htm>. Acesso em: 13/03/2013a.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos: Mecanismos enzimáticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm> Acesso em: 8/03/2013b.
- ARVANITI, K. *et al.* The importance of colonization pressure in multiresistant *Acinetobacter baumannii* acquisition in a Greek intensive care unit. **Crit Care.**, v.16, n.3, p.102, 2012.
- ATHERTON, D.J. A review of the pathophysiology, prevention and treatment of irritant diaper dermatitis. **Curr Med Res Opin.**, v.20, p.645-649, 2004.
- AVEZUM, A.; GUIMARÃES, H.P. Diagnóstico e tratamento - Uso racional de testes diagnósticos e exames complementares em medicina. In: LOPES, A.C. **Diagnóstico e tratamento, vol. 3.** Barueri, SP: Manole, 2007. 1723-1730. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?id=KI4lcyKdGsAC&pg=PR32&lpg=PR32&dq=Uso o+racional+de+testes+diagn%C3%B3sticos+e+exames+complementares+em+medicina.&source=bl&ots=mw7Fjcan4J&sig=M-CG54fgJj1fzdwOM7grIFnoB0Y&hl=pt-](http://books.google.com.br/books?id=KI4lcyKdGsAC&pg=PR32&lpg=PR32&dq=Uso+racional+de+testes+diagn%C3%B3sticos+e+exames+complementares+em+medicina.&source=bl&ots=mw7Fjcan4J&sig=M-CG54fgJj1fzdwOM7grIFnoB0Y&hl=pt-)>

BR&sa=X&ei=vI0FUqjKDcKA2wXM_oDQDg&ved=0CD0Q6AEwAg#v=onepage&q=Uso%20racional%20de%20testes%20diagn%C3%B3sticos%20e%20exames%20complementares%20em%20medicina.&f=false>. Acesso em: 05/06/2013.

BACKMAN, C. *et al.* An integrative review of infection prevention and control programs for multidrug-resistant organisms in acute care hospitals: a socio-ecological perspective. **Am J Infect Control.**, v.39, n.5, p.368-378, 2011.

BAUMGART, A. M. K.; MOLINARI, M. A.; SILVEIRA, A. C. O. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. **Braz J Infect Dis.**, v.14, n.5, p. 433-436, 2010.

BEHTA, M.; ROSS, B.; CHAUDHRY, R. A comprehensive decision support system for the identification, monitoring and management of patients with multi-drug resistant organisms (MDRO). **AMIA Annu Symp Proc.**, v.6, p.1218, 2008.

BEN-DAVID, D. *et al.* Potencial role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.6, p.620-626, 2010.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev.**, v.9, n.2, p.148-165, 1996.

BERTRAND, X. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: unexpected low prevalence of carriage in elderly French residents. **Age Ageing.**, v.41, n.2, p.233-237, 2012.

BILAVSKY, E.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*?: proactive versus reactive strategies. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.23, n.4, p.327-331, 2010.

BONTEN, M. J. *et al.* The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. **Arch Intern Med.**, v.158, n.10 p.1127-1132, 1998.

BORER, A. *et al.* Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 30, n.10, p.972-976, 2009.

BOUCHER, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.48, n.1, p.1-12, 2009.

BOYCE, J.M, *et al.* Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. **J Clin Microbiol** 32: 1148-1153, 1994.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**: Módulo III. Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas para identificação, prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes**. Nota Técnica nº 1/2010 de 25 de outubro de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado “New Delhi Metalobetalatamase” ou NDM no Brasil”. Comunicação de Risco n.001/2013 de 03 de abril de 2013a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Atualização do comunicado de risco n. 001/2013 – GVIMS/GGTES-Anvisa, que trata da circulação de micro-organismo de resistência denominado “New Delhi Metalobetalactamase” ou NDM no Brasil. Comunicado de Risco n. 002/2013 de 29 de abril de 2013b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano de contingência dos mecanismos de resistência nas infecções relacionadas à assistência à saúde por enterobactérias do estado do Rio Grande do Sul (Plaçon-RM). Jun. 2013c.

BRATU, S. *et al.* Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Arch Intern Med.**, v.165, N.12, p.1430-1435, 2005.

BRATU, S. *et al.* Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brookling, New York. **Clin Infect Dis.**, v.44, n.7, p.972-975, 2007.

BRICEÑO, D.F. *et al.* Atualización de la resistencia a antimicrobianos de bacilos gram-negativos aislado en hospitals de nivel III de Colombia: años 2006, 2007 y 2008. **Biomédica**, v. 30, n.3, p. 371-381, 2010.

BUEHLMANN, M. *et al.* Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.29, n.6, p.510-516, 2008.

BUEHLMANN, M. *et al.* The inguinal Skin: an important site of colonization with Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 31, n.4, p.427-428, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.

CALFEE, D.; JENKINS, S.G. Use of active surveillance to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.29, p.966-968, 2008.

CANTÓN, R. *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clin Microbiol Infect.**, v.13, p.144-153, 2008.

CARMELI, Y. *et al.* Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. **Clin Microbiol Infect.**, v.16, n.2, p.102-111, 2010.

CARVALHO, E.S.; MARQUES, S.R. Infecção hospitalar em pediatria. **J Pediatr.**, v.75, sup.1, p.31-45, 1999.

CASELLAS, J.M. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. **Rev Panam Salud Publica.**, Washington, v.30, n.6, p.519-528, dec. 2011.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings.** Estados Unidos da América, 2006.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v.58, n.10, p.256-260, 2009a.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections.** Estados Unidos da América, 2009b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/CAUTI/CAUTIguideline2009final.pdf>>. Acesso em: 12/07/2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.* **A Public health action plan to combat antimicrobial resistance.** Estados Unidos da América, 2012a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/action-plan-2012.pdf>>. Acesso em: 10/05/2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE): 2012 CRE toolkit.** Estados Unidos da América, 2012b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf>>. Acesso em: 26/07/2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Stop infections from lethal CRE germs.** Estados Unidos da América, mar. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/VitalSigns/pdf/2013-03-vitalsigns.pdf>. Acesso em: 01/07/2013.

CHAI, J. C. *et al.* Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, n.6, p.2014-2018, 2008.

CHITNIS, A. S. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a long-term acute care hospitals: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.33, n.10, p.984-992, 2012.

CIOBOTARO, P *et al.* An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an acute care setting: from theory to practice. **Am J Infect Control.**, v.39, n.8, p.671-677, 2011.

CLANCY, M. *et al.* Active screening in high-risk units is an effective and cost-avoidant method to reduce the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.27, n.10, p.1009-1017, 2006.

CLIMO M. W. *et al.* Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection. **N Eng J Med.**, v.368, n.6, p.533-542, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement M100-S23.** CLSI document, v. 33, n. 1, p.1-199, 2013.

COHEN, M. J. *et al.* Institutional control measures to curtail the epidemic spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a 4-year perspective. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.32, n.7, p.673-678, 2011.

D'AGATA, E.M. *et al.* High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis.**, v.34, n.2, p.167-172, 2002.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature.**, v.208, N.5007, p.239-241, 1965.

D'AZEVEDO, P.A. *et al.* Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains light years apart from its first isolation in SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.50, n.4, p.155-198, 2008.

DALLA COSTA, L.M. *et al.* Vancomycin-resistant Enterococcus faecium: first case in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v.2, n.3, p.160-163, 1998.

DENKINGER, C. M. *et al.* Increased multi-drug resistance among the elderly on admission to the hospital – A 12-year surveillance study. **Archives of Gerontology and Geriatrics.** v.56, n.1, p.227-230, 2012.

DIMOEDI, A. P. *Acinetobacter baumannii* pan-resistant. Update in epidemiological and antimicrobial managing issue. **Rev Chil Infect.**, v.22, n.4, p.298-320, 2005.

DOI, Y. *et al.* Screening for *Acinetobacter baumannii* colonization by use of sponges. **J Clin Microbiol.**, v.49, n.1, p.154-158, 2011.

DONSKEY, C. J. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. **Clin Infect Dis.**, v.39, n.2, p.219-226, 2004.

DONSKEY, C. J. Antibiotic regimens and intestinal colonization with antibiotic-resistant Gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis.**, v.43, sup.2, p.S62-S69, 2006.

EBER, M. R. *et al.* Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. **Arch Intern Med.**, v.170, n.4, p.347-353, 2010.

EHRILCH, R. L. *et al.* Acinetobacter baumannii infection in hospitals. **Clin Microbiol Infect.**, v.2, n.2, p.1-2, 2003.

EISLER, P. Deadly superbugs invade U.S. health care facilities. **USA Today**, 2012.

ESCAUT, L.; BOUAM, S.; FRANK-SOLTYSIAK, M. Eradication of an outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus (VRE): the cost of a failure in the systematic screening. **Antimicrob Resist Infect Control.**, v.2, n.1, p.18, 2013.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. Estolcomo: **ECDC.**, 2011.

EVANS, H. L. *et al.* Effects of chlorhexidine whole-body bathing on hospital-acquired infections among trauma patients. **Arch Surg.**, v.145, n.3, p.240-246, 2010.

FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **J Hosp Infect.**, v.64, n.1, p.7-15, 2006.

FOURNIER, P. E., RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin Infect Dis**, v.42, n.5, p.692-699, 2006.

GAIBANI, P. *et al.* Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1 in an Italian hospital, identified during the carbapenemases screening actions, June 2012. **Int J Infect Dis.**, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1201971213000970/1-s2.0-S1201971213000970-main.pdf?_tid=90c8abb2-ff7d-11e2-9f73-00000aab0f27&acdnat=1375892734_8eca3c00632a1350cdb62609a02f5a38>. Acesso em: 09/04/2013.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2003-2008). **Bras J Infec Dis.** v.13, n.2, p.3-9, 2008.

GALES, A. C.; SADER, H. H.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.44, n.3, p.301-311, 2002.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis.**, v.41, n.6, p.848-854, 2005.

GO, E.S. *et al.* Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. **Lancet.**, v.344, p.1329-1332, 1994.

GODDARD, S.; MULLER, M.P. The efficacy of infection control interventions in reducing the incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the nonoutbreak setting: a systematic review. **Am J Infect Control.**, v.39, p.599-601, 2011.

GOULD, C. V. *et al.* Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.4, p.319-326, 2010.

GUILLET, M. *et al.* Epidemiology of patients harboring extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBLE), on admission. **Med Mal Infect.**, v.13, n.11, p.632-636, 2010.

GUPTA, N. *et al.* Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. **Clin Infect Dis.**, v. 53, n.1, p.60-67, 2011.

HAASE, R. *et al.* Results of surveillance cultures on a neonatal intensive care unit: a retrospective analysis. **Z Geburtshilfe Neonatol.**, v.217, n.2, p.56-60, 2013.

HARBOTTLE, H. *et al.* Genetics of antimicrobial resistance. **Anim Biotechnol.**, v.17, n.2, p.111-124, 2006.

HARRIS, A. D. *et al.* Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patients: implications for an active surveillance program. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.25, n.2, p.105-108, 2004.

HAWSER, S. P. *et al.* Antibiotic susceptibility of intra-abdominal infection isolates from India hospitals during 2008. **J Med Microbiol.**, v.13, p.1050-1054, 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.

HISTÓRIA de Alexander Fleming. **J Bras Patol Med Lab.** v.45, n.5, p.1-1, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n5/v45n5a01.pdf>>. Acesso em: 12/03/2012.

HUTTNER, B. *et al.* Decolonization of intestinal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* with oral colistin and neomycin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Antimicrob Chemother.**, 2013. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2013/05/28/jac.dkt174.long>>. Acesso em: 14/03/2013.

ISTURIZ, R.E.; CARBON, C. Antibiotic use in developing countries. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.38, n.1, p.38-43, 2000.

JACOBY, G.A.; MUNHOZ-PRICE, L.S. The new beta-lactamases. **N Engl J Med.**, v.352, n.4, p.380-391, 2005.

JANS, B. *et al.* Epidemiology of multidrug-resistant microorganisms among nursing home residents in Belgium. **PLoS One.**, v.8, n.5, p.e64908, 2013.

JOHNSON, A.P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol.**, v.62, n.4, p.499-513, 2013.

JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect.**, v.11, n.11, p.868-73, 2005.

KAARME, J. *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in healthy Swedish preschool children. **Acta Paediatr.**, v.10, n.6, p.655-600, 2013.

KALLEN, A. J.; SRINIVASAN, A. Current Epidemiology of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli in the United States. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.31, n .51., p.51-54, 2010.

KALLEN, A. J. *et al.* Multidrug resistance among Gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.5, p.528-531, 2010.

KLEVENS, R.M. *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA.**, v.298, p.1763-1771, 2007.

KNOTHE, H. *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime on clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.**, v.11, n.6, p.315-317, 1983.

KOTHARI, C. *et al.* Community acquisition of β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in neonatal gut. **BMC Microbiol.**, v.13, p.136, 2013.

KHUNTAYAPORN, P. *et al.* Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *P. aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. **Annals of Clinic Microbiol and Antimicrob.**, v.11, p.25, 2012.

KUNZ, A. N.; BROOK, I. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. **Chemotherapy.**, v.56, n.6, p.492-500, 2010.

LANDELLE, C.; PAGANI, L.; HARBARTH, S. Is patient isolation the single most important measure to prevent the spread of multidrug-resistant pathogens? **Virulence.** v.4, n.2, p.163-171, 2013.

LAUTENBACH, E. *et al.* Test characteristics of perirectal and rectal swab compared to stool sample for detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.49, n.2, p.798-800, 2005.

- LECLERQ, R. *et al.* Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New Engl J Med.**, v.319, n.3, p.157-161, 1988.
- LEE, B. Y. *et al.* Economic impact of *Acinetobacter baumannii* infection in the intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.10, p.1087-1089, 2010.
- LEVIN, A. S. *et al.* An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.17, p.366-368, 1996.
- LEUNG, E. *et al.* The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v.89, n.5, p.390-392, 2011.
- LEWIS, J. D. *et al.* Admission surveillance for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a long-term acute care hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.34, n.8, p: 832-834, 2013.
- LIPSITCH, M.; SAMORE, M. H. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. **Emerg Infect Dis.**, v.8, n.4, p.347-354, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v.8, n.4, p.557-584, 1995.
- LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. **Clin Infect Dis.**, v.36, sup.1. p.11-23, 2003.
- LOWE, C. *et al.* Toronto ESBL Working Group. Disparity in infection control practices for multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Am J Infect Control.**, v.40, n.9, p.836-839, 2012.
- LOWE, C. F. *et al.* Efficacy of admission screening for extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. **PLoS One.**, v.8, n.4, p.e62678, 2013.
- LUCET, J. C. *et al.* Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital. **Clin Infect Dis.**, v.29, n.6, p.1411-1418, 1999.
- LUVSANSCHARAV, *et al.* Fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nursing homes in the Kinki region of Japan. **Infect Drug Resist.**, v.6, p.67-70, 2013.
- MANCHANDA, V., SANCHAITA, S., SINGH, N. P. Multidrug resistant *Acinetobacter*. **J Glob Infect Dis.**, v.2, n.3, p.291-304, 2010.
- MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. How can we stem the rising tide of multidrug-resistant gram-negative bacilli?. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.4, p.338-340, 2010.
- MARCHAIM, D. *et al.* Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol.**, v.45, n.5, p.1551-1555, 2007.

MARCHAIM, D. *et al.* Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, p.1413-1418, 2008.

MARCHAIM, D. *et al.* Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, n.2, p.593-599, 2011.

MARCHAIM, D. *et al.* The burden of multidrug-resistant organisms on tertiary hospitals posed by patients with recent stays in long-term acute care facilities. **Am J Infect Control.**, v.40, n.8, p.760-765, 2012.

MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol.**, v.48, n.5, p. 1866-1871, 2011.

MARTONE, W. J. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.19, n.8, p.539-545, 1998.

MATHAI, E. *et al.* Educating healthcare workers to optimal hand hygiene practices: addressing the need. **Infection.** v.38, p.349-356, 2010.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactams antibiotics. **Clin Infect Dis.**, v.24, sup.1, p.S19-S45, 1997.

MENDES, R. E., *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol.** v. 45, n. 2, p. 544-7, 2007.

MONTECALVO, M. A *et al.* Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.16, n.12, p.680-685, 1995.

MORGAN, D. J. *et al.* Improving efficiency in active surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant *Enterococcus* at hospital admission. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 31, n.12, p.1230-1235, 2010.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in a long-term acute care hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, n.4, p.341-347, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica.** 4.ed. Madri: Elsevier, 2004.

MUTO, C. A. *et al.* SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.24, n.5, p.362-386, 2003.

NAAS, T., *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla KPC gene. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 52, n. 4, p. 1257-63, 2008.

NAAS, T., *et al.* Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 3086-92, 2010.

NEVES, Z.C.P.D. *et al.* Higienização das mãos: o impacto de estratégias de incentivo à adesão entre profissionais de saúde de uma unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev Latino Am Enfermagem**, v.14, n.4, p.546-552, 2006.

NISHIHARA, Y. *et al.* Evaluation with a focus on both the antimicrobial efficacy and cumulative skin irritation potential of chlorhexidine gluconate alcohol-containing preoperative skin preparations. **Am J Infect Control**., v.40, n.10, p.973-978, 2012.

NOGUEIRA, K. S. **Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba.** Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NORDMANN, P.; CRUZON,G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis.**, v.9, n.4, p.228-236, 2009.

NORDMANN, P. *et al.* The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol.**, v.19, n.12, p.588-595, 2011.

NORDMANN, P. *et al*, the European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infec.**, v.18, n.5, p.432-438, 2012.

NORITOMI, D.T. *et al.* Is compliance with hand disinfection in the intensive care unit related to work experience? **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.28, p.362-364, 2007.

OLIVEIRA, G. *et. al.* Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Braz J Infec Dis.**, v.5, n.4, p.163-170, 2001.

OSTROWSKY, B. E. *et al.* Control of vancomycin-resistant *Enterococcus* in health care facilities in a region. **N Engl J Med.**, v.344, n.19, p.1427-1433, 2001.

OTTER, J. A. Hospital infection control in 2012: new solutions for old and resurgent problems. **Journal of Healthcare-associated Infection.**, v.5, n.1, p.68-72, 2012.

PATERSON, D. L., BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev.**, v.18, n.4, p.657-686, 2005.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **Int J Antimicrob Agents.**, v.42, sup.1, p.25-28, jun. 2013.

- PATEL, G. *et al.* Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.29, n.12, p.1099-1106, 2008.
- PATEL, G.; BONOMO, R.A. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. **Front Microbiol.**, v.4, p.48, 2013.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.
- PENDERS, *et al.*, The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. **Front Microbiol.**, v.4, p.87, 2013.
- PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras – História**, s.3, v.6, p.129-151, 2005.
- PLAYFORD, E. G.; CRAIG, J. C.; IREDELL, J. R. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. **J Hosp Infect.**, v.65, n.3, p.204-211, 2007.
- POGORZELSKA, M.; STONE, P.; LARSON, E. L. Wide variation in adoption of screening and infection control interventions for multi-drug-resistant organisms: a national study. **Am J Infect Control.**, v.40, n.8, p.696-700, 2012.
- POIREL, L., *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 3, p. 622-32, 2000.
- POP-VICAS, A. *et al.* Multidrug-resistant gram-negative bacteria in a long-term care facility: prevalence and risk factors. **J Am Geriatr Soc.**, v.56, n.7, p.1276-1280, 2008.
- POULOU, A.; *et al.* Imported *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones in a greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination. **J Clin Microbiol.**, v.50, n.8, p.2618-2623, 2012.
- PRABAKER, K. *et al.* Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a multihospital study. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 33, n.12, p.1193-1199, 2012.
- PUZNIAK, L. A., *et al.* To gown or not to gown: the impact of gowns on VRE acquisition. **Clin Infect Dis.**, v. 35, n.1, p.18-25, 2002.
- QUEENAN, A. M. ; BUSH, K. Carbapenemases : the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol. Rev.**, v. 20, p.440-458, 2007.
- QUINN, J.P. *et al.* Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.33, n.9, p.1451-1456, 1989.

- QUINTEROS, M., *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 9, p. 2864-7, 2003.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Rang And Dale – Farmacologia**. 7.ed. São Paulo: Elsevier, 2012.
- RICE, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **Am J Inf Cont.**, v.34, n.5, sup.1, p.S11-S19, 2006.
- RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**, v.197, n. 8, p. 1079-81, 2008.
- RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Summary trends for the meropenem yearly susceptibility test information collection program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 65, n.4, p. 414-426, 2009.
- ROONEY, P. J. *et al.* Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. **J Antimicrobial Chemother.**, v.64, n.3, p. 635-641, 2009.
- ROSETHAL, V. D. *et al.* International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued 2009. **Am J Infect Control.**, v. 38, n.2, p.95-104, 2010.
- ROSSI, F. The Challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis** v.52, n.9, p. 1138-1143, 2011.
- RUPP, M. E. *et al.* Effect of hospital-wide chlorhexidine patient bathing on healthcare-associated infections. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.33, n.11, p.1094-1100, 2012.
- SADER, H., MOET, G., JONES, R. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin America hospitals. **J Chemother.**, v.21, n.6, p.611-620, 2009.
- SAGA,T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **JMAJ**. v.52, n.2, p.103-108, 2009.
- SAHM, D. F. *et al.* In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.33, n.9, p.1588-1591, 1989.
- SALYERS, A.A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends Microbiol.**, v.12, n.9, p.412-416, 2004.
- SALYERS, A.A.; MOON, K.; SCHLESINGER, D. The human intestinal tract – a hotbed of resistance gene transfer? Part II1. **Clin Microb Newsletter.**, v.29, n.4, p.25-30, 2007.

SANDORA, J. S. *et al.* Identifying antibiotic-resistant bacteria in hospitalized patients: what is the role of active surveillance cultures?. **Clinical Chemistry**, v.59, p.11, 2013.

SANTANA, S. L., *et al.* Assessment of healthcare professionals adherence to hand hygiene after alcohol-based hand rub introduction at an intensive care unit in Sao Paulo, Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.28, n.3, p.365-367, 2007.

SANTOS, R.P.; MAYO, T.W.; SIEGEL, J.D. Healthcare epidemiology: active surveillance cultures and contact precautions for control of multidrug-resistant organisms: ethical considerations. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n1, p.110-116, 2008.

SCHABERG, D. R.; WEINSTEIN, R. A.; STAMM, W. E. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant gram-negative bacilli: epidemiology and control. **J Infect Dis.**, v.133, n.3, p.363-366, 1976.

SCHWABER, M.J. *et al.* Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. **Clin Infect Dis.**, v.52, n.7, p.848-855, 2011.

SHAFFER, J.G.; GOLDIN, M. Diagnóstico clínico por el laboratorio. In: DAVIDSON, I.L.; HENRY, J.B. **Epidemiologia hospitalaria**. 5.ed. Salvat Editores, 1974, p. 1041-1059.

SIEGEL, J.D. *et al.* Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. **Am J Infect Control**, v.35, n.10, sup.2, p. 65-164, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Betalactâmicos e Quinolonas. Disponível em: <http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=657&tipo_detalhe=s>. Acesso em: 19 de junho de 2013a.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Cefalosporinas. Disponível em: <http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=654&tipo_detalhe=s>. Acesso em: 19 de Junho de 2013b.

STRENGER, V. *et al.* Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria in hospital newborns. **Int J Antimicrob Agents.**, v.37, n.1, p.67-69, 2011.

STUMPFS, D. J. *et al.* The impact of a single ward for cohorting patients with infection due to multidrug-resistant organisms. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 34, n.8, p.864-865, 2013.

SUNENSHINE, R. H. *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. **Emerg Infect Dis.** v.13, n.1, p.97-103, 2007.

TENOVER, F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clin Infect Dis.**, v.33, sup. 3, p. 108-115, 2006.

THOMSOM, D. J. P. A. C. J. **Molecular approaches for the detection and Identification of β -lactamases.** In: N. W. A. A. P. Johnson (Ed.). *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press, v.1, 1998. Molecular approaches for the detection and Identification of β -lactamases, p.495-512.

TRENCH, F. Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos: Como controlar KPC na prática. Curitiba, 14 dez. 2012. Palestra proferida em reunião da APARCIH (Associação Paranaense de Controle de Infecção) no Hospital Nossa Senhora das Graças.

THURLOW, C. J. *et al.* Anatomic sites of patient colonization and environmental contamination with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at long-term acute care hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.34, n.1, p.56-61, 2013.

TOWNER, K. J. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. **J Hosp Infect.**, v.73, n.4, p.355-363, 2009.

UNAL, S., GARCIA-RODRIGUEZ, J. A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. **Diagn Microbiol Infect Dis.**,v.53, n.4, p.265-271, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções relacionadas à assistência á saúde.** São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.hcnet.usp.br/adm/dc/gcih/manual_antiinfecciosos/manual_antiinfecciosos_2012_2014_2.pdf>. Acesso em: 23/07/2013.

VERNON, M. O. *et al.* Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit: the effectiveness of source control to reduce the bioburden of vancomycin-resistant *enterococci*. **Arch Intern Med.**, v. 166, n.3, p.306-312, 2006.

WALKER, B. *et al.* Looming global-scale failures and missing institutions. **Science**, v. 325, n. 5946, p. 1345-1346, 2009.

WEINTROB, A.C., *et al.* Natural history of colonization with gram-negative multidrug-resistant organisms among hospitalized patients. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 31, n.4, p. 330-337, 2010.

WEINSTEIN, J.W. *et al.* Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant *enterococci*. **J Clin Microbiol.**, v.34, n.1, p.210-212, 1996.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 1, p. 154-5, 2006.

WOODWARD, B.; SHURKIN, J.; GORDON, D. **Scientist Greater than Einstein: the Biggest Lifesavers of the Twentieth Century**. 1. ed. Linden Publishing, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO Guidelines on hand hygiene in health care (Advanced Draft). Global Patient Safety Challenge 2005-2006**. Geneva: WHO Press, 2006. 205 p. Disponível em: <<http://www.who.org>>. Acesso em: 02/08/2013.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.

ZAHAR, J. R. *et al.* Duration of colonisation by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamase and risk factors for persistent fecal carriage. **J Hosp Infect.**, v.75, n.1, p.76-68, 2010.

ZHANG, J. F. *et al.* Carbapenem resistance mechanism and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a university hospital in Xian, China. **Microb Drug Resist.**, v.15, n.1, p.41-45, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	121
APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PAIS DE FILHOS MENORES DE 18 ANOS	124
APÊNDICE 3 – TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO.....	127
APÊNDICE 4 – ROTEIRO PARA A COLETA DE SWAB INGUINAL	128
APÊNDICE 5- INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS PARA A PESQUISA: CULTURAS DE VIGILÂNCIA PARA DETECÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES	130

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, ELAINE DREHMER DE ALMEIDA CRUZ e CHRISTIANE J. NIEBEL STIER, pesquisadoras da Universidade Federal do Paraná, estamos lhe convidando a participar de um estudo intitulado **Culturas de Vigilância Para Detecção de Enterobactérias Multirresistentes**

Com o surgimento, nos últimos anos, de bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos, tornou-se necessário um controle constante de diversos pacientes hospitalizados, para conhecer se durante a sua permanência no Hospital alguma destas bactérias foi adquirida. A maioria destas bactérias adquiridas, permanece no intestino, por isto são chamadas de "Enterobactérias Multirresistentes" sem que o paciente apresente qualquer sintoma suspeito, que nos permita reconhecer tal presença. Este controle deve ser feito através da coleta de exames específicos. Hoje, na rotina deste hospital este exame é realizado coletando-se cultura da região retal (ânus).

O objetivo desta pesquisa é saber se determinados pacientes adquiriram alguma bactéria resistente aos antibióticos e comparar qual o melhor local para coletar o exame, se a região retal (ânus) ou a região inguinal (conhecida como "virilha"). A região inguinal foi considerada por nós pesquisadoras como um local de mais fácil coleta do exame, por não haver necessidade da introdução de material de coleta, em região anal, como é feito de rotina no Hospital, quando há a necessidade de saber se o paciente adquiriu bactérias resistentes aos antibióticos.

Caso o Senhor(a) participe da pesquisa, será necessário realizar, além da coleta do exame na região reta (ânus), como é a rotina do hospital, a coleta de 2 culturas inguinais, em 2 dias seguidos, isto é, será passado uma espécie de "cotonete" (swab bacteriológico) umedecido com líquido estéril que chamamos de soro fisiológico, nos 2 lados na região da "virilha". Estas coletas serão realizadas no início da manhã, antes de seu banho, em 2 dias seguidos. Os exames serão encaminhados e realizados no Laboratório de Bacteriologia do próprio hospital.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde UFPR.

Em, 30 / 05 / 2012

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: tornar mais fácil e simples a forma de coleta dos exames para a identificação de pacientes portadores de bactérias resistentes a antibióticos. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

A pesquisadora Enf. Christiane J. NiebelStier, Enfermeira do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar deste Hospital, Mestranda do Mestrado Profissional em Enfermagem, pode ser encontrada no 2º. Andar do Prédio Central do Hospital, sala 238, das 08:00 às 18:00hs no fone 3360-1842 ou celular 9914-9362. E a pesquisadora Elaine Drehmer de Almeida Cruz, professora do Departamento de Enfermagem e do Programa de Mestrado Profissional pelo celular 8416-8951. Os responsáveis por este estudo poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que o Senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (pesquisadoras, médico, enfermeira e outros profissionais do hospital responsáveis por seu tratamento, quando for o caso). No entanto, os resultados do estudo serão divulgados de forma total e de forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, materiais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como:

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 30 / 05 / 2012

Eu, _____ li ou tomei conhecimento desse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. .

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)
Local e data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Pesquisador

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 30/05/2012

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PAIS DE FILHOS MENORES DE 18 ANOS.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS DE FILHOS MENORES DE 18 ANOS.

Nós, Prof^a. Dr^a. Elaine Drehmer de Almeida Cruz e Enf^a. Christiane J. Niebel Stier, pesquisadoras da Universidade Federal do Paraná, estamos solicitando sua autorização para que seu filho(a) venha a participar de um estudo intitulado “**Culturas de Vigilância Para Detecção de Enterobactérias Multirresistentes**”.

Com o surgimento, nos últimos anos, de bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos, tornou-se necessário um controle constante de diversos pacientes hospitalizados, para conhecer se durante a sua permanência no Hospital, alguma destas bactérias foi adquirida. A maior parte destas bactérias adquiridas permanece no intestino, por isto são chamadas de “Enterobactérias Multirresistentes” sem que o paciente apresente qualquer sintoma suspeito, que nos permita reconhecer tal presença. Este controle deve ser feito através da coleta de exames específicos. Hoje, na rotina deste Hospital este exame é realizado coletando-se cultura da região retal (ânus).

O objetivo desta pesquisa é saber se determinados pacientes adquiriram alguma bactéria resistente aos antibióticos e comparar qual o melhor local para coletar o exame, se a região retal ou região inguinal (conhecida como “virilha”). A região inguinal foi considerada por nós pesquisadoras como um local de mais fácil coleta do exame, por não haver necessidade da introdução do material de coleta, em região anal, como é feito na rotina no Hospital, quando há necessidade de saber se o paciente adquiriu bactérias resistentes aos antibióticos.

Caso o Senhor(a) concorde com a participação do seu filho(a) na pesquisa, será necessário realizar, além da coleta do exame na região retal, como é a rotina do hospital, a coleta de 2 culturas inguinais, em 2 dias seguidos, isto é, será passado uma espécie de “cotonete” (swab bacteriológico) umedecido com líquido estéril, nos 2 lados na região da “virilha”. Estas coletas serão realizadas no início da manhã, antes do banho de seu filho(a), em 2 dias seguidos. Os exames serão encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia do próprio Hospital.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: tornar mais fácil e simples a forma de coleta dos exames para identificação de pacientes portadores de bactérias resistentes a antibióticos. No entanto, nem sempre seu filho(a) será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal_ _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

A pesquisadora Christiane J. Niebel Stier, Enfermeiro do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar deste Hospital, Mestranda do Mestrado Profissional em Enfermagem, pode ser encontrada no 2º. Andar do Prédio Central do Hospital, sala 238, das 08:00 às 18:00hs no fone 3360-1842 ou celular 9914-9362. E a pesquisadora, Profª. Elaine Drehmer de Almeida Cruz, professora do Departamento de Enfermagem e do Programa de Mestrado Profissional pelo celular 8416-8951. Os responsáveis por este estudo poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que o Senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária e, se não quiser mais que seu filho(a) participe da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (pesquisadoras, médico, enfermeira e outros profissionais do Hospital responsáveis pelo tratamento de seu(a) filho(a) quando for o caso). No entanto, os resultados do estudo serão divulgados de forma total e de forma codificada, para que a **identidade de seu filho(a) seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, etc.) não são de sua responsabilidade e pela participação do seu filho(a) no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, _____ li ou tomei conhecimento desse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei que meu filho(a) _____ participasse. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do meu filho(a) a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento do meu filho(a).

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal_ _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Eu autorizo voluntariamente meu filho(a) a participar do estudo.

(Assinatura do responsável legal)

Local e data

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido representante legal para a participação do estudo.

Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE

Local e data

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

APÊNDICE 3 – TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: CULTURAS DE VIGILÂNCIA PARA DETECÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Investigador: Profª. Drª. Elaine Drehmer de Almeida Cruz

Local da Pesquisa: Hospital

Endereço: Rua: General Carneiro, 181 - CEP: 80060-900

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de saber se alguns pacientes ao internarem no Hospital de Clínicas adquiriram alguma bactéria resistente aos antibióticos que são normalmente usados no tratamento de infecções. Para tanto, pretendemos pesquisar qual o melhor local para coletar o exame para encontrar estas bactérias, se a região retal ou inguinal (conhecida como "virilha"). A região inguinal foi considerada pelas pesquisadoras como um local de mais fácil coleta para este exame.

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 30/05/2012

Rubricas: Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE 4 - ROTEIRO PARA A COLETA DE SWAB INGUINAL

NOME DO PROCEDIMENTO: **Coleta de Swab Inguinal**

OBJETIVO DO PROCEDIMENTO:

Padronizar a coleta de swab inguinal para culturas de vigilância para bactérias multirresistentes (VRE, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, BGNs ESBL e KPC)

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS:

Luvas de Procedimentos

Avental de Contágio

Kit de Swab bacteriológico

Ampola de 10ml com solução fisiológica 0,9% estéril

Gaze umedecida com solução alcoólica a 70%

Requisição para Solicitação de Exame

CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS:

Os pacientes e/ou familiares deverão ser esclarecidos sobre a necessidade do procedimento e como será realizado.

Evitar qualquer tipo de constrangimento adicional ao paciente.

PROCEDIMENTO

Identificar o tubo contendo swab bacteriológico com: nome do pcte; registro; amostra de swab inguinal; data e horário da coleta.

Higienizar as mãos, com álcool a 70%, com 30 segundos de fricção;

Vestir avental de contágio e calçar luvas de procedimentos;

Fazer desinfecção da ampola de solução fisiológica, com álcool a 70%;

Abrir a ampola de Soro Fisiológico com técnica asséptica;

Abrir o kit contendo swab bacteriológico;

Umedecer o swab bacteriológico com Soro Fisiológico 0,9%, com 2 gotas;

Posicionar o paciente, em decúbito dorsal, com as pernas estendidas ou fletidas conforme o paciente, desde que haja presença de prega cutânea;

Friccionar o swab umedecido em região inguinal bilateral, com 15 movimentos de vaivém em cada lado;

Colocar o swab dentro do tubo de ensaio, fechá-lo com técnica asséptica;

Enviar o swab em tubo de ensaio estéril ao Laboratório de Bacteriologia, em prazo máximo de 2 horas após a coleta.

OBS: - Coletar o swab inguinal sempre no primeiro horário da manhã, antes do banho, para não ocorrer interferência no resultado. Em Unidades em que o banho é dividido entre os turnos manhã, tarde e noite, a coleta deverá ser realizada antes do banho. No caso do banho ser à noite, coletar o exame até as 16:30 horas.

- A região inguinal é delimitada anatomicamente entre a crista ilíaca e a sínfese púbica.

**APÊNDICE 5 - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS PARA A PESQUISA:
CULTURAS DE VIGILÂNCIA PARA DETECÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
MESTRADO PROFISSIONAL

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS PARA A PESQUISA:
CULTURAS DE VIGILÂNCIA PARA DETECÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES

Mda Christiane J. Niebel Stier

Orientadora Prof^a Dr^a Elaine Drehmer de Almeida Cruz

1) NOME DO PACIENTE: _____

2) REGISTRO: _____ P (____) C (____)

3) DIAGNÓSTICO: _____

4) UNIDADE DE INTERNAÇÃO: 1. (____)

5) SEXO: 1. () M 2. () F 6) IDADE: _____

7) 1. () ACAMADO 2. () DEAMBULANDO

8) INCONTINÊNCIA URINÁRIA: 1. () Sim. 2. () Não.

9) INCONTINÊNCIA FECAL: 1. () Sim. 2. () Não.

10) DATA DE RESULTADO POSITIVO ANTERIOR DE SWAB RETAL:

____/____/____

11) DATA DESTA COLETA : ____/____/____

12) MICRORGANISMO ISOLADO:

13) DATA DE COLETA DO 1º. SWAB INGUINAL: * ____/____/____

14) HORÁRIO: _____

15) RESULTADO DO 1º. SWAB INGUINAL:

16) DATA DE COLETA DO 2º. SWAB INGUINAL: * ____ / ____ / ____

17) HORÁRIO: _____

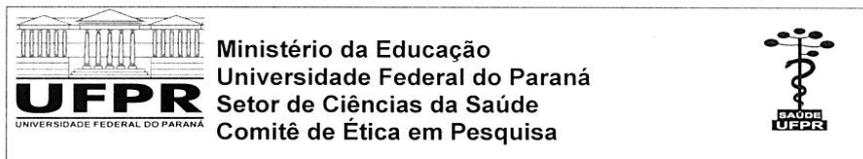
18) RESULTADO DO 2º. SWAB INGUINAL:

* Coleta feita de acordo com rotina proposta pela mestranda

Bioquímico responsável do Laboratório de Bacteriologia

ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ...	133
ANEXO 2 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA COLETA DE SWAB RETAL	134
ANEXO 3 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA	136

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Curitiba, 01 de junho de 2012.

Ilmo (a) Sr. (a)
Elaine Drehmer de Almeida Cruz
Christiane Johnscher Niebel Stier

Nesta

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Cultura de vigilância para detecção de enterobactérias multirresistentes**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 25 abril de 2012 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 30 de maio de 2012.

Registro **CEP/SD**: 1322.023.12.04

CAAE: 01647112.2.0000.0102

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial ou relatório final via Plataforma Brasil: 01.12.2012.

Atenciosamente



Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

ANEXO 2 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA COLETA DE SWAB RETAL

Nome do procedimento: Coleta de Swab Retal

Objetivo do procedimento:

Orientar a coleta de swab retal para pesquisa microbiológica de bactérias multirresistentes (VRE, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, BGNs ESBL e KPC) conforme protocolo de vigilância da unidade.

Equipamentos e materiais:

1. Luvas de procedimentos
2. Avental de contágio
3. Kit de swab para enviar material ao laboratório
4. Solicitação de exame

Considerações especiais

- Os pacientes, ou seus responsáveis, deverão ser orientados sobre a necessidade do procedimento e como ele será realizado;
- Evitar qualquer tipo de constrangimento ao paciente;
- Os swabs devem ser coletados com intervalo mínimo de 24h, para garantir uma nova microbiota e conseqüentemente maior sensibilidade ao teste;
- As coletas devem ser realizadas pela equipe de enfermagem e nunca pelo próprio paciente;

Procedimentos:

1. Higienizar as mãos conforme POP específico;
2. Vestir avental de contágio verde e calçar luvas de procedimentos;
3. Introduzir **um cm** de um swab estéril no reto do paciente, além de esfíncter anal;
4. Fazer **dois movimentos** circulares de 360º, para recolher material da mucosa retal;
5. Evitar tocar o swab na parte perianal e glúteos;
6. Verificar, após coleta, se existe **coloração fecal** no algodão do swab. Caso o algodão esteja branco ou com fragmentos de fezes, repetir a coleta;
7. Enviar o swab ao laboratório no mesmo tubo de ensaio que serviu de transporte para o swab, em um prazo máximo de 30 minutos após a coleta;
8. Coletar as amostras preferencialmente de 2ª até 4ª feira, até as 17 horas

Referências

- ANVISA, Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde: Módulo III. Brasília, 2004.
- Trabulsi, L.R. et al. Microbiologia, 3ed, Atheneu, 2002.
- CDC – Management Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings, 2006.
- CDC – Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, 2007.

- Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde – Manual de Orientação para Controle de disseminação de *Acinetobacter* sp. Resistente a Carbapenêmicos no Município de Porto Alegre, 2007.
- Couto, R.C.; Pedrosa T.M.G.; Nogueira J.M. Infecção Hospitalar e outras Complicações Não-infecciosas da Doença - Epidemiologia, Controle e Tratamento, Medsi, 3ed., Rio de Janeiro, Editora Médica, 2003.
- Cruz, E.D.A; Stier, C.J.N.; Bragagnolo K.L.; Paganini, M.C.;Castro, M.E.S.; Lange, V.L.; Preveção de Infecção Hospitalar-Manual Prático, Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, 2003.
- Fernandes, A.T. Infecção Hospitalar e suas interfaces na Área de Saúde, São Paulo: Ed. Atheneu,2000.
- Mayhall, C.G. Hospital Epidemiology and Infection Control, 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- SESA-PR – Resolução SESA nº 0674/2010.

ANEXO 3 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA - BM

1.1.1.1 POP Nº SAC	Pág. 01
Título: PCR Para Detecção de Genes de Resistência e Outros Genes	
Sinonímia: Reação em Cadeia da Polimerase p/Genes de Resistência (PCR – R)	
Metodologia: Amplificação de genes pela reação em cadeia da polimerase	

1. TEMPO DE EXECUÇÃO

2:30 horas.

2. PRINCÍPIO

Esse documento descreve os procedimentos necessários para detectar genes de resistência e outros genes em bactérias clinicamente importantes por amplificação desses genes usando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS:

1. PCR é extremamente sensível. E a contaminação em qualquer estágio da reação levará a resultados não reprodutíveis e custos desnecessários.
2. Todo o trabalho pode ser realizado sobre a bancada, desde que você seja cuidadoso e tiver consciência dos pontos potenciais de contaminação. No nosso caso, por se tratar de um laboratório diagnóstico utilizado por várias pessoas fazemos a reação em salas separadas.
 - Sala 1: Preparo da “Mastermix”
 - Sala 2: Extração do DNA alvo
 - Sala 3: Amplificação e detecção dos produtos.
3. As bancadas e as pipetas devem ser cuidadosamente limpas com gaze estéril umedecida úmida em álcool a – 70 °C antes de começar o trabalho e ao final do experimento.
4. Usar luvas todo o tempo e trocá-las sempre que for adicionar a Taq DNA polimerase.
5. Trocar as ponteiras em cada adição de reativos.
6. Faça o experimento em etapas:
 - Diluição dos primers

Preparo do DNA alvo
Preparo da Mastermix”
Incubar a reação no Termociclador
Fazer a detecção dos produtos

3. AMOSTRA

Semear os microrganismos em ágar nutriente para crescimento overnight a 37°C.

4. PREPARO DA AMOSTRA (DNA ALVO)

PREPARO DO DNA ALVO (SALA 2)

O DNA a ser usado como alvo para PCR pode ser preparado por vários métodos diferentes. Como a PCR é bastante sensível, não há necessidade do DNA ser muito puro, preparações não purificadas são suficientes.

Na Bacteriologia:

Cresça os MOs usados na PCR em placas de ágar não seletivo por uma noite a temperatura mais adequada para cada microrganismo (geralmente 36,5-37°C).

Faça a suspensão bacteriana na Bacteriologia e leve-a para ser preparada na SALA 2 em tubos fechados.

Na Sala 2:

Com fervura

- a. Numerar tubos Eppendorf de 1.5 ml correspondentes a cada amostra
- b. Distribuir 500 µl de água Milli-Q estéril
- c. Preparar uma suspensão densa (Bacteriologia)
- d. Agitar em vortex levemente
- e. Ferver os tubos por 15 minutos
- f. Centrifugá-los por 5 minutos em microcentrífuga a 2000 rpm.
- g. Remova uma alíquota do sobrenadante (que contem o DNA) e estoque a temperatura de 4°C até o uso.
- h. Use uma alíquota de 2 µl dessa amostra em cada reação de PCR.

Sem fervura

- a. Numerar tubos Eppendorf de 500 µl com número correspondente a cada amostra.
- b. Distribuir 100 µl de água Milli-Q estéril.
- c. Suspender 2 colônias de cada amostra a ser testada (Bacteriologia).
- d. Tomar cuidados extremos para não fazer contaminação cruzada das amostras.
- e. Adicionar um tubo com amostra positiva, outro com amostra negativa e o terceiro com água (sem DNA).
- f. Homogenizar as amostras no vortex e pulse por 10-15 segundos.
- g. Dispensar cuidadosamente 2 µl de cada DNA alvo (sobrenadante) para cada reação de PCR.

5. PREPARO DOS REAGENTES

PRIMERS

Verifique se os primers estão dissolvidos, caso contrário dissolva-os em água Milli-Q estéril até a concentração final de 1µg/µl e prepare a “primer mix” para a concentração recomendada pelo protocolo utilizado para a reação.

Como dissolver os primers:

1. Coloque os tubos de primers liofilizados dentro da Câmara de Fluxo Laminar (ou concentrados).
2. Usando luvas limpas, adicione água Milli-Q estéril até a concentração final de 1µg/µl.
3. Agitar em agitador vortex com delicadeza até a dissolução completa do liofilizado no fundo do tubo, observado com o desaparecimento da coloração branca no fundo do tubo.
4. Centrifugue rapidamente.
5. Estocar os primers diluídos em freezer a -20°C e podem ser usados posteriormente em múltiplas ocasiões.

PRIMER MIX: IDEAL 5-10 PICOMOL

6. Usando luvas limpas, preparar a mistura diluída do par de primers em um tubo de 500 µl.
7. Misture 5 µl de cada primer (equivalente a 5 µg) e ajuste até o volume final da mistura de 100 µl adicionando água Milli-Q estéril. Homogeneizar bem em vortex e pulsar em microcentrífuga. A concentração final é de 50 ng/ µl.
 - i. 5 µl de cada primer em 100 µl de água MILLI-Q (10 µg em 100 µl de Primer Mix – 0,5 µg/µl ou 50 ng/ µl).
 - ii. 4 µl dessa solução (200 ng) em 100 µl de reação (para 4 amostras de 25 µl cada reação). Concentração final é igual a 2 ng/ µl.
8. No momento do uso retire o frasco da mistura do freezer à -20°C e aguarde até a dissolução.
9. Mantenha os tubos dissolvidos da “primer mix” em banho de gelo até o uso.
10. Após o uso estocar a primer mix em freezer a -20°C até o uso posterior.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

4. PREPARO DA “PCR-MASTER MIX” (SALA 1)

A detecção de genes de resistência (e outros) genes pode ser facilmente realizada usando volumes de reação de 25 µl. Isso reduz consideravelmente o custo da PCR.

1. Retirar os tubos com as soluções de dNTPs, MgCl_2 e “primers mix” do freezer a -20°C , aguardar o descongelamento. Após o descongelamento manter as soluções em banho de gelo.
2. Água MILLI-Q estéril.
3. Numerar os tubos de reação correspondentes às amostras a serem testadas + um controle positivo , um controle negativo e um tubo branco (que conterá todos os reagentes exceto o DNA alvo).
4. Prepare a PCR-Master Mix em um tubo Eppendorf adicionando os reagentes na ordem descrita na tabela abaixo. (Observar que uma receita usa mistura de dNTPS e outra utiliza os dNTPs separados).
5. Numere um tubo Eppendorf (MM) de 1.5 ml (1500µl) ou 0.5 ml (500µl), dependendo da quantidade de amostras a serem analisadas.
6. Distribua a água em quantidade suficiente para o número de reações a serem testadas.

7. Adicione o tampão da enzima (Fem conc. 10X junto com a Taq DNA polimerase).
8. Adicione o MgCl₂.
9. Adicione os dNTPs (mistura ou cada um deles individualmente).
10. Adicione cuidadosamente 4 µl da mistura de primers diluído a cada 100 µl de "PCR-Master-Mix". Obs.: Ou volume adequado de dNTPs necessário ao volume escolhido de Mastermix.
11. Adicione os primers.
12. Mudar as luvas e adicionar 0,5 µl (2.5U) de Taq polimerase a cada 100 µl de "PCR-Mastermix".
13. Homogeneizar bem em vortex e pulse em microcentrífuga.
14. Distribua 23 µl da "PCR-Mastermix" (contendo os primers e a Taq polimerase) a cada tubo de reação, previamente numerados.
15. Levar os tubos para a SALA 2.

Volume	50 µl	100µl	150µl	200µl	300µl	600µl	1 ml
Nº de reações	2	4	6	8	12	24	40
1. Água Milli-Q estéril	41.5	83	124.5	166	249	498	830
2. Tampão da Taq DNA pol 10X	5	10	15	20	30	60	100
4. MgCl ₂ (50mM)	2	4	6	8	12	24	40
dNTPs mix (12,5mM)	1	2	3	4	6	12	20
5. Primer mix	2	4	6	8	12	24	40
6. Taq DNA pol	0.25	0,5	0.75	1	1,5	3	5

Marcas recomendadas: 3. e 4.: Gibco; 4. Bioline.

Manter a "PCR-Mastermix" em gelo se não for usar imediatamente.

Se Não tiver dNTP mix pronta (concentração 12.5 mM), podem ser usadas soluções separadas (1mM cada – Life Technologies). Nesse caso preparar a "PCR-Mastermix" seguindo a receita abaixo. Os volumes abaixo estão calculados para 100 µl (4 reações).

Volume	50 µl	100µl	150µl	200µl	300µl	600µl	1 ml
Nº de reações	2	4	6	8	12	24	40
1. Água Milli-Q estéril	37.5	75	112.5	150	225	450	750
2. Tampão da Taq DNA pol 10X	5	10	15	20	30	60	100
4. MgCl ₂ (50mM)	2	4	6	8	12	24	40
dATPs (10mM)	1.25	2.5	3.75	5.0	7,5	15	25
dGTPs (10mM)	1.25	2.5	3.75	5.0	7,5	15	25
dCTPs (10mM)	1.25	2.5	3.75	5.0	7.5	15	25
dTTPs (10mM)	1.25	2.5	3.75	5.0	7.5	15	25
dNTP mix caseira	5	10	15	20	30	60	100
5. Primer mix	2	4	6	8	12	24	40
6. Taq DNA pol	0.25	0.5	0.75	1	1.5	3.0	5.0

Master Mix usando Taq da Promega

Volume	50µl	100µl	150µl	200µl	300µl	600µl	1 ml
Nº de reações	2	4	6	8	12	24	40
1. Água Milli-Q estéril	32.8	65.6	98.4	131.2	196.8	393.6	656
2. Tampão da Taq DNA pol 10X	10	20	30	40	60	120	200
4. MgCl ₂ (50mM)	4	8	12	16	24	48	80
dNTP mix	1	2	3	4	6	12	20
5. Primer mix	2	4	6	8	12	24	40
6. Taq DNA pol	0.25	0.5	0.75	1	1.5	3	3.6

5. PREPARO DA REAÇÃO:

11. Adicione 2 µl da amostra (DNA ALVO ARMAZENADO A 4°C) ao tubo de reação contendo 23 µl da "PCR-Mastermix" (vol final da reação 25 µl).
12. Homogeneizar bem em vortex e pulse em microcentrifuga.
13. Fechar bem os tubos.
14. Levá-los para a sala 3.
15. Ligar o Termociclador.
16. Conferir a programa a ser utilizado.
17. Transferir os tubos para o termociclador e colocá-los no poço do bloco meno.
18. Fechar a tampa do aparelho para o lado correspondente ao tamanho do tubo.
19. Pressionar a tecla start e deixar a reação prosseguir.

6. CONDIÇÕES DE CORRIDA:

As condições de corrida são extremamente variáveis e poder ter que ser determinadas empiricamente. Entretanto, há extensiva literatura disponível e se a seqüência de primers for obtida de um colega, este pode dar sugestões úteis.

As condições usadas para fazer amplificação multiplex do gene de resistência a meticilina *mecA*, gene de resistência de alto nível ao mupirocin *mupA*, e gene 16S rRNA de *S. aureus* são:

Ciclo *MecA*

Ciclos	1 X (desnaturação do DNA alvo)	94°C	5 min
	30X	94°C (desnaturação)	60 seg
		52°C (anelamento)	30 seg
		72°C (extensão do primer)	30 seg
	1X (extensão final)	72°C	10 min

Ciclo
Van
(VAN,
CTX
e
OXA)

As

condições usadas para amplificação multiplex dos genes de resistência a glicopeptídeos *vanA* e *vanB* de Enterococos, *ctx-M* em *Enterobacteriaceae* e *Oxa* em *A. baumannii* São:

Ciclos	1 X (desnaturação do DNA alvo)	94°C	5 min
	30X	94°C (desnaturação)	25 seg
		52°C (anelamento)	40 seg
		72°C (extensão do primer)	50 seg
	1X (extensão final)	72°C	6 min

CTX -
initial
denatu-
ration
at
94°C
for 5

min; 30 cycles of 94°C for 25 s, 52°C for 40 s, and 72°C for 50 s; and a final elongation at 72°C for 6 min.

OXA- initial denaturation at 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 25 s, 52°C for 40 s, and 72°C for 50 s; and a final elongation at 72°C for 6 min.

Depois de remover os tubos do termociclador, os produtos de PCR são analisados imediatamente em gel de agarose ou podem ser estocados a 4°C.

6. ANÁLISE DOS PRODUTOS

1. Preparar gel de agarose a 2% em tampão TBE a 0,5X (adequado para análise de produtos de PCR, que apresentam tamanho menos que 1Kb). Agarose padrão para Biologia Molecular é satisfatória para essa finalidade.

2. Remover uma alíquota do produto de PCR de 4 µl de cada amostra
3. Misturar 4 µl de "Stop mix" (50mM EDTA pH8, 25% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol) a cada amostra (fazer isso sobre um pedaço de parafilme).
4. Alternativamente, adicionar 10 µl de Stop mix ao volume total de 25 µl do produto de PCR e vortex rapidamente.
5. Carregar o gel com 5 µl de cada amostra.
6. Incluir marcador de PM linear (2 µl de 123bp ladder ou 2 µl de 100bp ladder (ou 123 bp) misturados com 4 µl PM + 4 µl de tampão de corrida ("Stop mix"). Correr 4 µl.
7. Proceder a eletroforese a 90-150V (dependendo do tanque e o fonte utilizada) por aproximadamente 1- 1,5 horas. Corar o gel em solução X% de brometo de etídio e fotografado.
8. Se o produto está puro e não há contaminação da PCR, é possível usar 1 µl do produto como alvo para experimentos de PCR subseqüentes - ex.: para marcar os produtos de PCR com digoxigenina para serem usados como sonda). OBS.: Isso só pode ser possível se forem seguidos os passos 2 e 3 e não o 4 e não for adicionada a "Stop mix" no volume total dos produtos de PCR.

4. ARMAZENAMENTO E ENVIO AO LABORATÓRIO

5. CRITÉRIOS PARA REJEIÇÃO DA AMOSTRA

6. REAGENTES E MATERIAIS

Tampão TBE 5X concentrado

Água Milli-Q estéril (p/Salas 1, 2, 3)

Solução estoque de Brometo de Etídio a 10mg/mL (**Solução de uso:** adicionar 50 µl dessa solução a 500 ml de água destilada).

Agarose ultra-pura para preparo do gel para a eletroforese

Tubos plásticos estéreis do tipo Eppendorf de 1,5 mL (Novos), (p/Salas 1, 2, 3)

Tubos plásticos estéreis do tipo Eppendorf de 0,5 mL (Novos), (p/Salas 1, 2, 3)

Tubos plásticos estéreis do tipo Eppendorf de 0,2 mL (Novos), (p/Salas 1, 2, 3)

Ponteiras estéreis com filtro de 1000µl (p/Salas 1 e 2)

Ponteiras estéreis com filtro de 200µl (p/Salas 1, 2 e 3)

Ponteiras estéreis com filtro de 10µl (p/Salas 1, 2 e 3)

7. EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

Agitador de tubos tipo "Vortex" (Salas 1 e 2)

Banho-Maria

Termobloco

Microcentrífuga (Salas 1 e Sala 2)

Aparelho fotográfico e transiluminador com luz Ultra-violeta

Tanque de eletroforese

Fonte de eletroforese

Bandeja para preparo do gel de agarose (Sala 3)

Pentes para moldar os poços do gel de agarose (Sala 3)

Estufas bacteriológicas a 37°C

Geladeira (p/Salas 2 e 3)

Freezer -20°C (p/ Salas 1, 2 e 3)

Pipeta de 1000 µl (P1000) (p/ Salas 1, 2 e 3)

Pipeta de 1000 µl (P200) (p/ Salas 1, 2 e 3)

Pipeta de 10µl (P10) (p/ Salas 1, 2 e 3)

Vidraria em geral:

Frascos pyres de 50ml, 500ml e 1000ml com tampa de rosca para armazenar os reagentes.

Erlenmayer de 200 ml, 2000 ml e 3000 ml.

Provetas de 50 ml, 2000 ml, 500 ml, 1000 ml e 2000 ml.

Pipetas descartáveis de 5 ml, 10 ml, 20 ml e 25 ml.