



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

Daniely Martins da Silva

**Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um
hospital público do Distrito Federal**

CEILÂNDIA, DF

2016

Daniely Martins da Silva

Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um hospital público do Distrito Federal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico Generalista na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier

CEILÂNDIA, DF

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Silva, Daniely M.

Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um hospital público do Distrito Federal. Brasília, 2016 / Daniely Martins da Silva. Brasília, UnB, 2016, 44p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília / Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2016. Orientação: Thaís Alves da Costa Lamounier

1. Resistência Bacteriana a antibióticos. 2. Bactérias. 3. Hospital Público.

Daniely Martins da Silva

**Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um
hospital público do Distrito Federal**

Banca Examinadora

Orientador: Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Rodrigo Haddad
(FCE/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos, me abençoando e por ter me ajudado em cada conquista.

A minha família e ao Mickael Costa por terem me dado todo o suporte necessário, essencialmente aos meus pais por serem a minha base.

Aos meus amigos, principalmente os de graduação que me proporcionaram as melhores experiências durante esses últimos 5 anos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Thais Lamounier, por ter aceitado o meu convite para a realização deste trabalho.

A Eulina Ramos, Emerson Valadares, Célio Faria Júnior e James Oki de Carvalho que compartilharam comigo os seus conhecimentos, me ajudando na realização deste trabalho.

RESUMO

Os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais foram resumidos pela sigla ESKAPE que são as iniciais das seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. as quais possuem altas taxas de resistência por conseguirem escapar das ações dos antimicrobianos. O objetivo do presente trabalho é traçar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana do grupo ESKAPE em um hospital primário da rede pública do Distrito Federal. Foi realizado um estudo transversal, retrospectivo e descritivo analisando os dados correspondentes de janeiro de 2010 a dezembro de 2015 para as amostras que foram positivas para os microrganismos do grupo ESKAPE. Ao analisar os gram-positivos quase 80% das cepas de *Enterococcus faecium* foram resistentes a vancomicina (VRE) e quase 40% das cepas de *Staphylococcus aureus* foram resistentes a oxacilina (MRSA). Ao analisar os gram-negativos observa-se que as cepas analisadas neste estudo apresentam uma taxa de resistência maior aos carbapenems do que em outros estudos. Quatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* foram positivas para o gene bla_{kpc} , 3 cepas para bla_{ndm} e uma cepa de *Acinetobacter baumannii* foi positiva para o gene bla_{oxa-23} . Estudos como este devem ser realizados periodicamente de modo a avaliar o perfil de susceptibilidade das bactérias e também demonstra a importância do uso de estratégias para evitar infecções nosocomiais bem como um maior controle na prescrição de antibióticos.

Palavras-chave: ESKAPE, resistência bacteriana a antimicrobianos, bactérias, hospital público.

ABSTRACT

The main pathogens of nosocomial infections were acronymically dubbed ESKAPE pathogens which are the initials of the following bacterias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp.*, capable of scaping the action of the antibiotics by representing resistance. The goal of this study is to trace the ESKAPE pathogens antimicrobial susceptibility profile in a primary public hospital in the Federal District, Brazil. A cross-sectional, retrospective and descriptive study was conducted by analyzing the corresponding data from January 2010 to December 2015 for samples that were positive for microorganisms of ESKAPE pathogens. Analyzing the gram-positive almost 80% of *E. faecium* were vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) and almost 40% of strains of *S. aureus* were Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). It was observed that gram-negative strains examined in this study have a higher rate of resistance to carbapenems than in other studies. Among nine strains, four strains of *Klebsiella pneumoniae* were positive for bla_{kpc} , three strains to bla_{ndm} and a strain of *Acinetobacter baumannii* was positive for bla_{oxa-23} gene. Studies like this should be periodically performed in order to evaluate the bacterial susceptibility profile and also demonstrates the importance of the implementation of strategies to prevent nosocomial infections and greater control in prescribing antibiotics.

Keywords: ESKAPE, bacterial drug resistance, bacteria, public hospital.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do Tempo: Descoberta dos principais antibióticos e introdução na terapêutica	13
Figura 2 – Perfil de susceptibilidade de <i>Enterococcus faecium</i>	30
Figura 3 – Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 4 – Perfil de susceptibilidade de MSSA	32
Figura 5 – Perfil de susceptibilidade de MRSA.....	33
Figura 6 – Perfil de susceptibilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
Figura 7 – Perfil de susceptibilidade de <i>Acinetobacter baumannii</i>	35
Figura 8 – Perfil de susceptibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 9 – Perfil de susceptibilidade de <i>Enterobacter spp.</i>	37
Figura 10 – Corrida de gel da PCR para pesquisa de KPC, NDM e OXA-23.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de Enterobactérias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.....	22
Tabela 2 – Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Tabela 3 – Reagentes utilizados para a realização da reação de PCR.....	26
Tabela 4 – Iniciadores utilizados	26
Tabela 5 – Prevalência dos microrganismos por ano.....	28
Tabela 6 – Microrganismos encontrados por tipo de amostra entre 2010 e 2015	29
Tabela 7 – Faixa etária por sexo das amostras positivas entre 2010 e 2015	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ESBLs	Beta lactamases de amplo espectro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IMP	Imipenemase
ITU	Infecções do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
M	Molar
MATE	<i>Multidrug and toxic-compound</i>
MBL	Metalo- β -lactamase
MDR	Microrganismo multirresistente
MF	<i>Major facilitator</i>
Mg ²⁺	Magnésio
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à oxacilina
NDM	New Delhi metalo- β -lactamase
OXA	Oxacilinas
PB	Pares de base
PBP2A	<i>Penicillin binding protein 2A</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RND	<i>Resistance-nodulation-division family</i>
rpm	Rotação por minuto
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Emergência
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>

SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-acetato-EDTA
UV	Ultravioleta
VIM	Verona imipenase
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
°C	Graus Celsius
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Antimicrobianos	12
1.2	Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos.....	14
1.3	Grupo ESKAPE	16
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVO.....	20
3.1	Objetivo Geral.....	20
3.2	Objetivos Específicos.....	20
4	METODOLOGIA.....	21
4.1	Caracterização do Estudo.....	21
4.2	Local do Estudo	21
4.3	Análise dos dados.....	21
4.4	Isolados bacterianos	24
4.5	Teste de Hodge	24
4.6	Teste de bloqueio enzimático com EDTA	25
4.7	Extração de DNA	25
4.8	Detecção molecular dos genes por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Microrganismos isolados.....	28
5.2	Perfis das amostras	28
5.3	Perfis dos pacientes.....	29
5.4	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana do grupo ESKAPE	30
5.5	Detecção molecular dos genes por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
6	CONCLUSÃO.....	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
	ANEXO 1 - Documento de aprovação do comitê de ética	52

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são a forma de vida mais abundante do planeta com mais de um milhão de espécies que podem ser encontradas em diversos ambientes (RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2013; WOOLHOUSE et al., 2015). Elas possuem uma grande adaptabilidade devido à plasticidade genômica e a capacidade de trocar informações genéticas entre diferentes espécies. Por estarem presentes em vários ambientes, as bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência para acelerar ou aumentar a taxa de adaptação e obter vantagem na adversidade (RODRÍGUEZ- ROJAS et al., 2013).

A descoberta das bactérias só ocorreu por volta de 1670 por Anton van Leeuwenhoek com a ajuda de um instrumento criado por ele, o qual ampliava as imagens. Apesar da desconfiança de que esses microrganismos pudessem causar infecções, somente em 1882, Robert Koch conseguiu fazer essa correlação, publicando a descoberta do bacilo causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Contudo, nem todas as bactérias são patogênicas ao ser humano, muitas são benéficas, como as que vivem no trato gastrointestinal (MARTÍN et al., 2013).

1.1 Antimicrobianos

Muitas pessoas acreditam que o primeiro contato com os antimicrobianos tenha sido no século passado, quando iniciou a produção dos mesmos. Entretanto, foram encontrados traços de tetraciclina em ossos datados de 350 a 550 anos dC (BASSET et al., 1980). A distribuição da tetraciclina nos ossos é explicada após a exposição na dieta a algum material que contenha tetraciclina. É difícil detectar se houve exposição a outros antimicrobianos, somente evidências anedóticas ou costumes que sobreviveram podem indicar alguma relação. Um exemplo de evidência anedótica é a propriedade antimicrobiana do solo vermelho na Jordânia que é utilizado historicamente para tratar infecções de pele e isso levou a descoberta de actinomicetos que produzem actinomicina c2 e c3 (AMINOV, 2010; FALKINHAM et al., 2009). Outra exposição seria através de remédios usados por

milênios na medicina tradicional, principalmente na medicina tradicional chinesa, onde descobriu a artemisinina, um antimalárico (AMINOV, 2010).

Antes do surgimento dos antibióticos milhões de pessoas morriam por infecções bacterianas. O primeiro antibiótico de origem sintética foi o salvarsan (Arsfenamina, um composto derivado do arsênico) desenvolvido em 1910 por Paul Ehrlich. A primeira classe dos antimicrobianos sintéticos foi a sulfonamida, descoberta em 1935, derivada do prontosil, mesmo possuindo baixo espectro de ação ainda é utilizada na clínica atual (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A descoberta da penicilina aconteceu em 1929 por Alexander Fleming, entretanto, a sua produção para fins terapêuticos só aconteceu em 1941, em decorrência da industrialização. O seu uso clínico salvou milhões de indivíduos que poderiam ter morrido decorrente de infecções bacterianas, inclusive os soldados da Segunda Guerra Mundial (DIAS; MONTEIRO; MENEZES, 2010; PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). A descoberta da penicilina abriu a era de ouro, entre os anos 1940 e 1960, onde foram descobertos vários antibióticos de fontes naturais: cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, eritromicina, vancomicina, cefalosporina (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) (Figura 1).

Nos anos 1960-1980 os antimicrobianos semi-sintéticos análogos aos antibióticos naturais foram colocados no mercado (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Durante esse período algumas classes sintéticas também foram descobertas, como as quinolonas, em 1962, as quais levaram ao desenvolvimento do ácido nalidíxico, posteriormente ciprofloxacino, entre outros. As oxazolidinonas foram descobertas em 1979 e atualmente o único representante desta classe no mercado é a linezolida (SINGH; BARRET, 2006) (Figura 1).

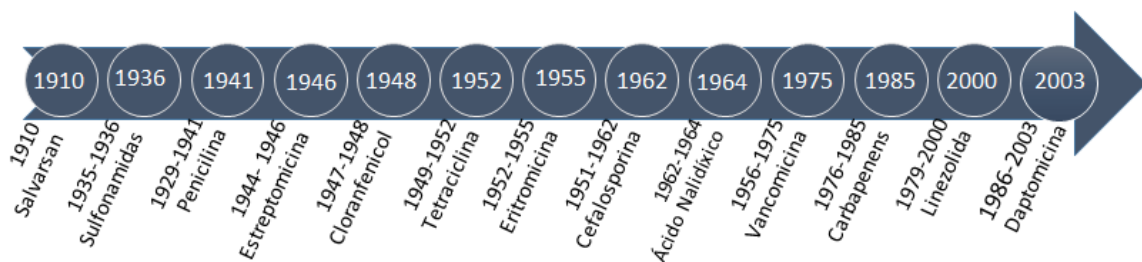


Figura 1 - Linha do Tempo: Descoberta dos principais antibióticos e introdução na terapêutica. Adaptado: BAQUERO; CANTÓN, 2009; LEWIS, 2013; SINGH et al., 2006

Posteriormente a genômica foi introduzida como ferramenta para descobrir novos antimicrobianos. Como a maioria dos antimicrobianos que atualmente são utilizados possui um número limitado de proteínas envolvidas nas funções celulares cruciais, o sequenciamento do genoma proporciona a identificação de novos sítios de ação. Três áreas de sítio de ação que produziram novas vias são: aminoacil-tRNA sintetase, peptídeo deformilase e biossíntese de ácido graxo. Outras áreas como replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), divisão celular, biossíntese do peptideoglicano, entre outras estão sendo estudadas. A aminoacil-tRNA sintetase é um dos primeiros grupos alvos de antimicrobianos derivados da genômica. A mupirocina é um antimicrobiano tópico pertencente a esse grupo sendo comercializada pelo nome BactrobanTM e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de isoleucil-tRNA (MCDEVITT; ROSENBERG, 2001).

1.2 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos

Apesar dos antimicrobianos terem sido um sucesso, há um uso indiscriminado destes tanto para fins terapêuticos quanto para uso não-terapêutico, como a sua utilização na pecuária para promover o crescimento animal (WOOLHOUSE et al., 2015) e a presença em alguns produtos antissépticos e desinfetantes (DIAS; MONTEIRO; MENEZES, 2010). Esse uso descontrolado levou a propagação de genes de resistência aos antimicrobianos e a seleção de cepas mais insensíveis aos antimicrobianos (RAVI et al., 2014).

A bactéria pode ser intrinsecamente resistente a um antimicrobiano, quando é uma característica inerente a uma espécie, estando relacionada a genes cromossomais (COX; WRIGHT, 2013; HUYCKE et al., 1998). Ou pode adquirir a resistência através de mutações cromossomais e de transferência horizontal de genes por meio de três mecanismos: 1) transdução mediada por bacteriófagos; 2) transformação por incorporação de fragmentos de cromossomos, plasmídeos e genes de organismos mortos no DNA da bactéria receptora e 3) conjugação através de plasmídeos e transposons conjugativos (ALEKSHUN; LEVY, 2007; HUYCKE et al., 1998). Essa transferência pode ocorrer na água, no solo, no alimento e no sistema digestivo de animais e humanos (VERRAES et al., 2013).

Em humanos, o consumo de água, carnes de frango, porco e gado contaminados com bactérias resistentes aos antimicrobianos quando estes alimentos não são cozidos adequadamente, pode levar a troca de material genético, e conseqüentemente genes de resistência, entre bactérias presentes no alimento, ao passar pelo trato gastrointestinal, e bactérias da microbiota humana (HUDDLESTON, 2014; SALYERS; GUPTA; WANG, 2004).

Dentre os mecanismos de resistência bacteriana estão à permeabilidade da membrana externa, bomba de efluxo, inativação enzimática e modificação do sítio de ação do antibiótico. Como a membrana externa da bactéria é relativamente impermeável para algumas classes de antimicrobianos, a permeabilidade ocorre através das porinas que são canais que permitem a passagem de nutrientes e restringem o influxo de vários antimicrobianos, por isso bactérias gram-negativas são resistentes à vancomicina, uma vez que o antimicrobiano não consegue atravessar essa membrana para atuar na inibição da parede celular (COX; WRIGHT, 2013).

Existem 5 famílias de bombas de efluxo em procariotos: transportadores de trifosfato de adenosina (*ATP binding cassette* (ABC), *multidrug and toxic-compound* (MATE), *major facilitator* (MF), *resistance-nodulation-division family* (RND), *small multidrug resistance* (SMR). O efluxo de antibióticos é um processo ativo, com exceção da família ABC que hidrolisa o ATP, as outras famílias utilizam a força motriz. A família RDN é em grande parte responsável pela resistência intrínseca em bactérias gram-negativas (COX; WRIGHT, 2013).

A inativação enzimática ocorre pela produção de enzimas que degradam ou modificam a estrutura da droga. Há três mecanismos: hidrólise, transferência de grupo ou mecanismo redox (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007). Em 1940, Edward Abraham e Erneset Chain relataram pela primeira vez uma resistência intrínseca envolvendo uma enzima num extrato de *Escherichia coli* que poderia anular os efeitos antibacterianos da penicilina antes dela ter sido usada clinicamente. Logo após a introdução da penicilina na terapêutica foram identificadas outras enzimas bacterianas com a habilidade de hidrolisar a penicilina (BUSH, 2004).

A modificação do sítio de ação do antimicrobiano faz com que este não consiga se ligar corretamente, em alguns casos essa modificação requer outras mudanças na célula para compensar as características que foram alteradas. Um

exemplo é a aquisição da proteína de ligação da penicilina 2A (PBP2A) que é codificada pelo gene *mecA* em *Staphylococcus aureus*, resultando na resistência à oxacilina e a maioria dos outros β -lactâmicos, devido ao fato dessa proteína ter baixa afinidade com β -lactâmicos (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007; WIELDERS et al., 2002; VERRAES et al., 2013). Para continuar com a biossíntese do peptídeoglicano, a PBP2A altera a estrutura e composição do peptídeoglicanos e isso envolve outros genes (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007).

A resistência bacteriana dificulta o tratamento dos pacientes já que é necessário o uso de antimicrobianos de amplo espectro, porém, o desenvolvimento e aprovação de novos fármacos crescem em uma velocidade muito menor do que o aparecimento da resistência bacteriana. O desenvolvimento da resistência bacteriana normalmente acontece 2 ou 3 anos após a introdução de um novo antibiótico na terapêutica (DAVIES, 2006) e um antibiótico pode levar de 12 a 22 anos para estar disponível no mercado (DEMAIN; SPIZEK, 2012). Isso gera uma redução da eficácia no tratamento antibacteriano tornando-o difícil, dispendioso ou até mesmo impossível, podendo aumentar o tempo de permanência hospitalar e muitas vezes podem ocasionar a morte do paciente (GRILLO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; WHO, 2014).

1.3 Grupo ESKAPE

Rice nominou em 2008 as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* de “ESKAPE”, por estas serem as principais bactérias causadoras de infecções nosocomiais nos Estados Unidos e por conseguirem escapar das ações dos antimicrobianos devido à resistência (RICE, 2008).

Os *Enterococcus spp.* são bactérias gram-positivas e as primeiras cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) apareceram na década de 80 (UTTLEY et al., 1988). O primeiro caso de VRE relatado no Brasil foi em 1996 em *Enterococcus faecium* (DALLA COSTA et al, 1998;). Há cinco fenótipos que

caracterizam a resistência à vancomicina: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE (GOLD, 2001).

Outra bactéria gram-positiva é o *Staphylococcus aureus*, caracterizado por catalase e coagulase positiva, anaerobiose facultativa, comensal e coloniza principalmente as vias aéreas (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). O *S. aureus* não causa somente infecções na pele, mas também em tecidos profundos, como endocardite e pneumonia e pode estar presente em abscessos (BOUCHER; COREY, 2008; KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). As primeiras cepas de *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA) foram identificadas na década de 60 (JEVONS; COE; PARKER, 1963). As mortes por infecções causadas por MRSA (19000 mortes em 2005) nos Estados Unidos foram semelhante às mortes por vírus da imunodeficiência humana (HIV) (15.798 em 2004), tuberculose (662 em 2004) e por hepatites virais (5.793 em 2002) quando somadas (BOUCHER; COREY, 2008).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae e é considerada oportunista. Normalmente coloniza a pele, faringe e trato gastrointestinal e pode estar envolvida em infecções de feridas, septicemia e pneumonia (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). A *K. pneumoniae* pode ser resistente aos betalactâmicos, exceto carbapanems, devido à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e pode ser resistente aos carbapanems com a produção de carbapenemases, principalmente *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), pertencente a Classe A de Amber e New Delhi metalo- β -lactamase (NDM-1) que pertence a Classe B de Amber (metalo- β -lactamase (MBL)) (ECHEVERRI; CATAÑO, 2010; NORDMANN, 2014). A classe A hidrolisa as penicilinas, cefalosporinas, carbapanems e o aztreonam, entretanto essa hidrólise é inibida *in vitro* pelo ácido clavulânico e tazobactam. Já a classe B hidrolisa todos os β -lactâmicos citados anteriormente, com exceção do aztreonam, e não tem sua atividade inibida por inibidores β -lactâmicos, como sua hidrólise depende da interação do β -lactâmico com íons de zinco em seu sítio catalítico, a sua atividade é inibida *in vitro* pelo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (NORMANN; DORTET; POIREL, 2012).

O bacilo gram-negativo *Acinetobacter baumannii* está envolvido em infecções do trato urinário, meningite secundária, infecções do trato respiratório associadas à

ventilação mecânica (CORTIVO et al., 2015) e também pode apresentar perfil resistência a várias drogas, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, sendo o carbapenem o medicamento de escolha, em casos de cepas multirresistentes. Entretanto, esta bactéria tem se tornado resistente aos carbapenems principalmente através da produção de carbapenemases da classe D, oxacilinases, sendo que no Brasil se destaca a OXA-23 (CHAGAS et al., 2014; CHAGAS et al., 2015).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* possui relevância nosocomial e trata-se de um bacilo gram-negativo não fermentador. Pode estar presente em infecções cirúrgicas e de feridas, pneumonia, fibrose cística e bacteremia (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). Dentre os mecanismos que contribuem na sua resistência estão à produção de ESBL que confere resistência às penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, MBL que confere resistência aos carbapenens, hiperexpressão de bombas de efluxo da família RDN, perda de porina e produção de diferentes β -lactamases. O grupo MBL é composto por várias enzimas as quais são frequentemente isoladas em *P. aeruginosa*. No Brasil já foram descritas cepas com imipenemase (IMP), Verona imipenase (VIM) e São Paulo metalo- β -lactamase (SPM-1) (NEVES et al., 2011; POLOTTO et al., 2012). *Enterobacter* spp. assim como outros membros da família Enterobacteriaceae pode ser resistente através da produção de ESBLs e carbapenemases ou β -lactamases do tipo AmpC (BOUCHER et al., 2009; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos que traçam o perfil de resistência bacteriana devem ocorrer periodicamente para contribuir com os dados epidemiológicos locais que podem ser comparados com os regionais, nacionais e até mesmo mundiais.

Esses dados auxiliam na conduta terapêutica, pois levam em consideração a eficácia clínica, prevalência na resistência local e o custo. Um estudo feito em Bogotá no período de 2005 a 2008 analisou o impacto econômico de MRSA (BARRERO et al., 2014). E em outro estudo realizado no Brasil pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina tiveram um consumo de antibióticos 3 vezes maior do que pacientes que estavam infectados com *S. aureus* sensível à oxacilina (GIMENES et al., 2016).

Assim, o presente estudo pode apresentar pontos relevantes e significativos para a saúde de pacientes da Rede Pública e Privada, bem como para o Sistema Único de Saúde (SUS) na redução de gastos relacionados aos antimicrobianos utilizados e na diminuição da morbimortalidade.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana do grupo ESKAPE em um hospital primário da rede pública do Distrito Federal.

3.2 Objetivos Específicos

- Traçar o perfil dos pacientes que tiveram amostras positivas;
- Analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados do grupo ESKAPE;
- Avaliar a prevalência de genes de resistência bla_{kpc} , bla_{ndm} , bla_{oxa-23} , bla_{imp} e bla_{vim} nas cepas que apresentaram resistência aos carbapenems.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização do Estudo

Foi realizado um estudo transversal, retrospectivo e descritivo analisando os dados correspondentes de janeiro de 2010 a dezembro de 2015 utilizando os dados do aparelho MicroScan Walkaway96 (Siemens®) do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas de um hospital da rede pública de Brasília, Brasil. Este aparelho identifica o microrganismo através dos testes bioquímicos e traça o perfil de susceptibilidade antimicrobiana através das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) utilizando uma leitura fluorométrica, colorimétrica ou turbidimétrica. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília CAAE: 38856114.0.0000.0030 (Anexo 1).

4.2 Local do Estudo

O hospital estudado é um hospital primário, com 17 leitos de internação para clínica médica e 17 para pediatria, 3 na sala vermelha e 2 na sala amarela. A sala vermelha é gerenciada pelo Serviço de Atendimento Móvel de Emergência (SAMU) e prestam atendimento a pacientes graves e que possuem risco de morte, a sala possui equipamentos para realizar ressuscitação cardiopulmonar, ventilação mecânica, intervenção em caso de acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. Já a sala amarela é para pacientes já estabilizados que passaram pela sala vermelha e/ou pacientes semicríticos, onde é realizada a monitoração cardíaca e de sinais vitais e suporte de oxigênio não invasivo. O laboratório atende os pacientes internados, pacientes que são atendidos no pronto socorro do hospital e de centros de saúde e postos de saúde que são próximos ao hospital.

4.3 Análise dos dados

Foram analisadas 577 amostras que foram positivas para os microrganismos do grupo ESKAPE através do software WHONET 5.6 observando dados como

idade, sexo e tipo de amostra (urocultura, hemocultura, swab retal, swab nasal e etc.). Gráficos e tabelas foram montados pelo Microsoft® Excel 2010.

O WHONET é um programa desenvolvido para análise e monitoramento de dados microbiológicos, principalmente para análise de resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foi desenvolvido em 1989 pelo Centro Colaborador de Vigilância de Resistência Bacteriana da Organização Mundial de Saúde, ajudando na compreensão de dados epidemiológicos, na escolha de antimicrobiano, detecção de surtos, entre outros (GOSH et al., 2013). É um programa gratuito, utilizado em mais de 90 países e está disponível em mais de 20 línguas.

A CIM utilizada para traçar o perfil de susceptibilidade foi interpretada a partir dos pontos de corte determinados pelo CLSI 2015 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*. (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*

(Continua)

Antimicrobianos	Gram-negativas					
	Enterobactérias		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter spp.</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	S	R	S	R	S	R
Amicacina	≤ 16	≥ 64	≤ 16	≥ 64	≤ 16	≥ 64
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	≤ 8	≥ 32	-	-	-	-
Ampicilina	$\leq 8^*$	$\geq 32^*$	-	-	-	-
Ampicilina/Sulbactam	≤ 8	≥ 32	-	-	≤ 8	≥ 32
Aztreonam	≤ 4	≥ 16	≤ 8	≥ 32	-	-
Cefalotina	≤ 8	≥ 32	-	-	-	-
Cefepima	≤ 2	≥ 16	≤ 8	≥ 32	≤ 8	≥ 32
Cefotaxima	≤ 1	≥ 4	-	-	≤ 8	≥ 64
Cefoxitina	≤ 8	≥ 32	-	-	-	-
Ceftazidima	≤ 4	≥ 16	≤ 8	≥ 32	≤ 8	≥ 32

Tabela 1 - Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*

(Conclusão)

Antimicrobianos	Gram-negativas					
	Enterobactérias		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter spp.</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	S	R	S	R	S	R
Ciprofloxacina	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4
Ertapenem	$\leq 0,5$	≥ 2	-	-	-	-
Gentamicina	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16
Imipenem	≤ 1	≥ 4	≤ 2	≥ 8	≤ 2	≥ 8
Levofloxacina	≤ 2	≥ 8	≤ 2	≥ 8	≤ 2	≥ 8
Meropenem	≤ 1	≥ 4	≤ 2	≥ 8	≤ 2	≥ 8
Norfloxacina	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16	-	-
Piperacilina/Tazobactam	≤ 16	≥ 128	≤ 16	≥ 128	-	-
Tetraciclina	≤ 4	≥ 16	-	-	≤ 4	≥ 16
Tobramicina	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16
Trimetoprim/Sulfametaxazol	≤ 2	≥ 4	-	-	≤ 2	≥ 4

Legenda: S: sensível. R: resistente.

– Não padronizado pelo CLSI.

* Não foi testado ampicilina para *Klebsiella pneumoniae*, pois a mesma possui resistência intrínseca a este antibiótico.

Tabela 2- Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*

(Continua)

Antimicrobianos	Gram-positivas			
	<i>Enterococcus spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	S	R	S	R
Ampicilina	≤ 8	≥ 16	-	-
Ciprofloxacina	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4
Clindamicina	-	-	$\leq 0,5$	≥ 4

Tabela 2- Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*

(Conclusão)

Antimicrobianos	Gram-positivas			
	<i>Enterococcus spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	S	R	S	R
Daptomicina	≤ 4	-	≤ 1	-
Eritromicina	$\leq 0,5$	≥ 8	$\leq 0,5$	≥ 8
Gentamicina	-	-	≤ 4	≥ 16
Levofloxacina	≤ 2	≥ 8	≤ 1	≥ 4
Linezolida	≤ 2	≥ 8	≤ 4	≥ 8
Oxacillina	-	-	≤ 2	≥ 4
Penicillina G	≤ 4	≥ 16	$\leq 0,12$	$\geq 0,25$
Tetraciclina	≤ 4	≥ 16	≤ 4	≥ 16
Trimetoprim/Sulfametaxazol	-	-	≤ 2	≥ 4
Vancomicina	≤ 4	≥ 32	≤ 2	≥ 16

Legenda: S: sensível. R: resistente.

– Não padronizados pelo CLSI.

4.4 Isolados bacterianos

Foi pesquisado genes de resistência das 8 cepas que foram enviadas ao LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal), nos anos de 2014 e 2015, sendo 7 cepas de *K. pneumoniae* e 1 cepa de *A. baumannii*. O critério utilizado pelo laboratório de microbiologia para o envio das enterobactérias foi a resistência aos carbapenens e apresentar o teste de Hodge modificado ou teste de bloqueio enzimático com EDTA positivo.

4.5 Teste de Hodge

De acordo com o CLSI (2015), para a realização do teste de Hodge modificado, semeia-se a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (turvação 0,5 na escala de McFarland e diluição 1:10) no ágar Mueller Hinton. Após 10 minutos é colocado um disco de ertapenem ou meropenem no meio da placa. Posteriormente

são feitas estrias do centro para a periferia com o controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705), controle negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706) e a amostra. Incuba-se a 35 ± 2 °C e a leitura é feita 20 horas depois. O teste é positivo quando houver uma invasão da cepa de *E. coli* no halo de inibição.

4.6 Teste de bloqueio enzimático com EDTA

Para execução do bloqueio enzimático com EDTA semeia-se a amostra (turvação 0,5 McFarland) no ágar Mueller Hinton. São colocados na placa discos de imipenem e meropenem com adição ou não de EDTA (10 µL de solução de EDTA 0,1 M). A placa é incubada a 35 ± 2 °C por 18-24 horas. O resultado é positivo quando há diferença ≥ 5 mm no halo de inibição entre os discos sem e com adição de EDTA (GISKE et al., 2012).

4.7 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita uma ressuspensão com alça de 1 µL de colônias bacterianas em 500 µL de água deionizada (Milli-Q System, Millipore, Bedford, MA), posteriormente fervidos por 15 minutos e congelados por 5 minutos. O sobrenadante foi obtido após centrifugação de 12.500 rpm por 5 minutos e posteriormente utilizado contendo o DNA bacteriano para as reações de amplificação.

4.8 Detecção molecular dos genes por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para confirmação molecular foi pesquisado os genes bla_{kpc} , bla_{ndm} , bla_{imp} , bla_{vim} por serem os mais prevalentes em enterobactérias resistente aos carbapenems e o gene bla_{oxa-23} , em *A. baumannii* resistente aos carbapenems no Brasil (CHAGAS et al, 2015; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

O volume total de cada reação foi de 20 µL (18 µL do mix de PCR e 2 µL de DNA). Para a reação de PCR, foi utilizado o mix 2X ReadyMix que contém a DNA polimerase do tipo KappaTaq (0.05 U/µL), Mg^{2+} e 0,4 mM de cada dNTP com corante de corrida para eletroforese (KappaBiosystems, Japan), os iniciadores (Tabela 3), água destilada, o gene que codifica a subunidade 16s ribossômico como controle de amplificação, exceto para o OXA-23 que foi utilizado o gene que codifica o OXA-51, e DNA bacteriano (Tabela 4). A *K. pneumonie* ATCC700603 foi utilizada

como controle negativo para KPC, NDM, IMP e VIM e *A. baumannii* ATCC19606, para OXA-23.

Tabela 3 - Reagentes utilizados para a realização da reação de PCR

Reagente	KPC, NDM e IMP	OXA-23	VIM
	(µL)		
H ₂ O	7,52	6,40	5,92
MIX (Kappa KappaBiosystems)	10,00	10,00	10,00
Iniciador 1	F e R= 0,40	OXA- 23 F e R= 0,4	OXA-48 F= 0,6
Iniciador 2	-	OXA-51 F e R= 0,4	OXA-48 R=0,6
Iniciador 3	-	OXA-58 F e R= 0,4	VIM F= 0,4
Iniciador 4	-	OXA-143 F e R= 0,4	VIM R= 0,4
Iniciador bla _{16-s} F	0,04	-	0,04
Iniciador bla _{16-s} R	0,04	-	0,04

Legenda: F: *forward*. R: *reverse*. KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. NDM: *New Delhi metallo-β-lactamase*. IMP: imipenemase. OXA-23: oxacilinase-23. VIM: Verona imipenemase.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados

(Continua)

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon (PB)	Controle Positivo
NDM F	5' GGTGGGCGATCTGGTTTTC	512	<i>Enterobacter cloacae</i> CCBH10892
NDM R	5' GGCCTTGCTGTCCTTGATC		
KPC F	5' TGCTACTGTATCGCCGTC	1011	<i>K. pneumoniae</i> IOC4955
KPC R	5' CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
OXA-23 F	5 'GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	<i>A. baumannii</i> IOC3174
OXA-23 R	5' ATTTCTGACCGCATTTCAT		

Tabela 4 – Iniciadores utilizados

(Conclusão)

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon (PB)	Controle Positivo
OXA-51 F	5'TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	-
OXA-51 R	5'TGGATTGCACTTCATCCTTGG		
OXA-58 F	5' AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	-
OXA-58 R	5' CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
OXA-143 F	5' TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	150	-
OXA-143 R	5'TAATCTTGAGGGGGCCAAC		
OXA-48 F	5' GCGTGGTTAAGGATGAACAC	440	-
OXA-48 R	5' ATCATCAAGTTCAACCCAACC		
VIM F	5' GATGGTGTTTGGTCGCATATC	332	<i>P. aeruginosa</i> CCBH11808
VIM R	5' CTCGATGAGAGTCCTTCTAGAG		
IMP F	5'AACACGGTTTGGTGGTTCTT	440	<i>K. pneumoniae</i> BR01
IMP R	5'GGACTTTGGCCAAGCTTCTA		

As reações foram submetidas à seguinte programação de ciclos de temperatura: 2 minutos a 94 °C, seguido por 40 ciclos, desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 58 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A reação de PCR foi encerrada com o ciclo de extensão a 72 °C por 2 minutos. Os produtos da reação de PCR, 15 µL, foram visualizados na eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X, seguido da coloração do gel em solução de brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram observados por transiluminação de luz ultravioleta (UV) usando KODAK Gel Logic 200 Imaging System (Eastman Kodak Company).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microrganismos isolados

Durante o período de estudo foram identificadas 577 cepas. O microrganismo mais prevalente foi *Klebsiella pneumoniae* (41%), seguido de *Staphylococcus aureus* (22%), *Pseudomonas aeruginosa* 14%, *Enterobacter spp.* (11%), *Acinetobacter baumannii* (8%), e *Enterococcus faecium* (4%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Prevalência dos microrganismos por ano

Microrganismo	Nº de isolados	(%)	2010	2011	2012	2013	2014	2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	234	41	9	7	53	53	56	56
<i>Staphylococcus aureus</i>	128	22	5	11	33	23	32	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81	14	11	2	24	25	9	10
<i>Enterobacter spp.</i>	65	11	-	2	17	12	20	14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	45	8	4	1	11	15	8	6
<i>Enterococcus faecium</i>	24	4	-	-	15	5	1	3
Total	577	100	29	23	153	133	126	113

5.2 Perfis das amostras

Os isolados analisados foram obtidos principalmente de urina (46%), swab retal (19%), swab nasal (11%) e sangue (8%) (Tabela 6). Em urina e swab retal o microrganismo mais encontrado foi *K. pneumoniae* e em swab nasal e sangue, foi *S. aureus*. A prevalência de *S. aureus* no swab nasal é esperada, já que em dois estudos, um feito no Brasil e outro nos Estados Unidos, a prevalência de colonização nasal por essa bactéria foi aproximadamente 30% (GORWITZ et al., 2008; PIRES et al., 2014).

Tabela 6 – Microrganismos encontrados por tipo de amostra entre 2010 e 2015

Microorganismo	Urina	Swab Retal	Swab Nasal	Sangue	Outros*
<i>Enterococcus faecium</i>	3	20	-	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	-	63	29	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	165	54	-	5	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	16	1	5	15
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	30	9	-	3	39
<i>Enterobacter spp.</i>	46	9	-	2	8
Total	269	108	64	45	91

* Outros: Abscesso, Cateter, Conjuntiva, Mama, Osso, Pé, Pele, Secreção, Traqueal, Ulcera externa, Zaragatoa.

Tanto o swab nasal quanto o swab retal são usados para detectar colonização e como vigilância admissional para internação, principalmente quando o paciente já ficou internado por mais de 48 horas em outra instituição. No swab nasal pesquisa-se principalmente MRSA e no retal, VRE e cepas de bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenems. Em caso de amostra positiva o paciente entra em precaução de contato. Em pacientes colonizados por MRSA, pode-se fazer descolonização (GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL, 2014).

O predomínio de urocultura é um indicativo para Infecções do Trato Urinário (ITU) e as ITUs nosocomiais são responsáveis por aproximadamente 40% das infecções hospitalares (KALSY et al., 2003). Os microrganismos encontrados na urocultura estão entre os principais relatados por Roriz-Filho e colaboradores (2010) onde responsáveis pela ITU nosocomial são *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* e *Enterococcus faecalis* e entre a ITU hospitalar há um aumento de *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecalis* e fungos e uma diminuição de *Escherichia coli* (RORIZ-FILHO et al., 2010).

5.3 Perfis dos pacientes

Ao analisar as amostras quanto idade e sexo, observa-se que 52% dos pacientes são do sexo masculino e 48,2% correspondem a faixa etária de 60 anos

ou mais (Tabela 7). A prevalência de pacientes com essa faixa etária é um fator preocupante, uma vez que são mais propensos a infecções devido ao declínio no sistema imune (GAVAZZI; KRAUSE, 2002).

Tabela 7 - Faixa etária por sexo das amostras positivas entre 2010 e 2015

Faixa etária (anos)	Total	%	Feminino	%	Masculino	%
0-9	40	6,9	20	7,2	20	6,7
10-19	16	2,8	16	5,8	0	0
20-59	206	35,7	103	37,1	103	34,4
60 ou +	278	48,2	124	44,6	154	51,5
Não relatado	37	6,4	15	5,4	22	7,4
Total	577	100	278	100	299	100

5.4 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana do grupo ESKAPE

O *E. faecium* apresentou maior resistência a eritromicina (95,8%), seguida por ciprofloxacino (91,7%), ampicilina (91,7%), penicilina G (91,7%) e vancomicina (79,2%) e apresentou maior sensibilidade a linezolida (87,5%) e daptomicina (83,3%) (Figura 2). Em um estudo feito entre 2006 e 2009 em um Hospital terciário no Triângulo Mineiro a ampicilina e penicilina apresentaram resistência de 75,4% (CONCEIÇÃO et al., 2011).

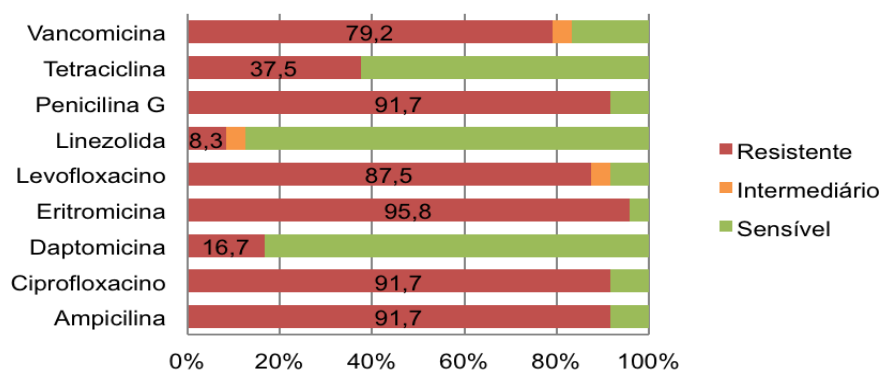


Figura 2 - Perfil de susceptibilidade de *Enterococcus faecium*

Das 24 cepas de *E. faecium*, 19 são VRE. Essas cepas resistentes à vancomicina vêm se tornando um problema mundial devido às infecções causadas

por essas cepas terem sido associadas com morbidade e mortalidade hospitalar (ROSA et al., 2014).

A maior resistência encontrada em *S. aureus* foi à penicilina G (96,9%), eritromicina (75,8%), ciprofloxacino e levofloxacino (63,3) e clindamicina (24,4%) e a menor resistência encontrada foi à vancomicina (2,3%), linezolida (3,9%), daptomicina (4,7%) (Figura 3). Esses últimos antimicrobianos são usados como última opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por MRSA (MONACO et al., 2016). Das 128 cepas, 44 são MSSA e 84 são MRSA.

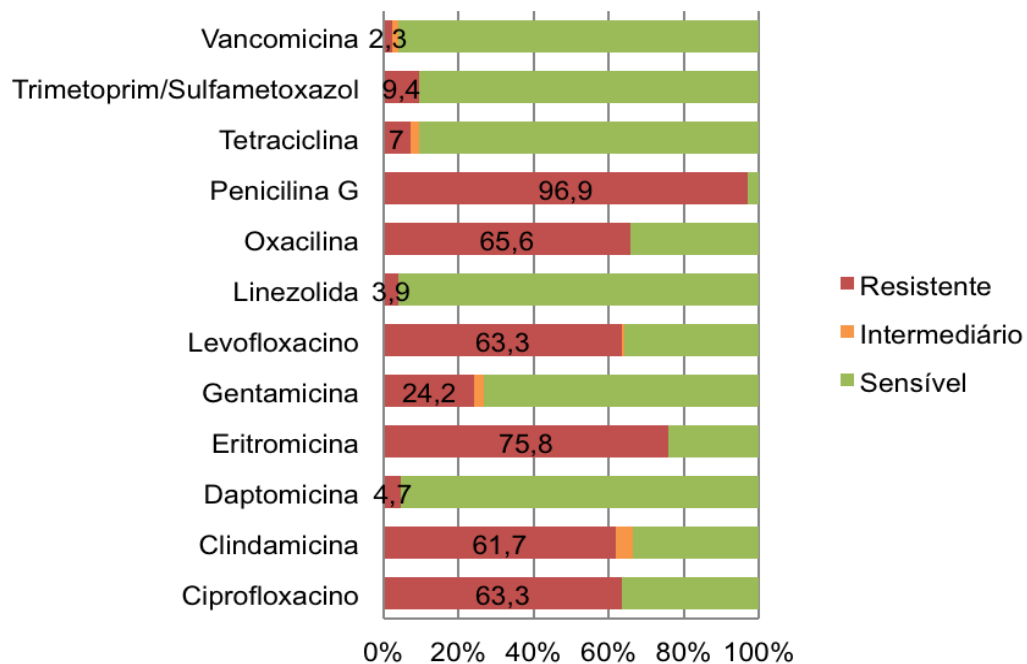


Figura 3 - Perfil de susceptibilidade de *Staphylococcus aureus*

Em 1997 teve a primeira descrição de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) em um paciente no Japão pré-infectado com uma cepa MRSA e essas cepas tinham a parede celular duas vezes mais espessa do que cepas controle (HIRAMATSU et al., 1997). Já em 2002, foi isolada a cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) em um paciente nos Estados Unidos e uma semana depois foi isolado em outro sítio, do mesmo paciente: VRSA, *E. faecalis* resistente à vancomicina e *Klebsiella oxytoca*. A presença do gene *vanA* na cepa de VRSA, sugere uma possível transferência desse gene do *E. faecalis* para *S. aureus* (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Por existir poucos relatos de VISA ou VRSA é necessário que essas cepas sejam enviadas ao LACEN-DF para confirmação. Os métodos de triagem e confirmação indicados pelo CLSI são a diluição em ágar com 6 µg/mL de vancomicina e detecção da CIM por método de diluição, respectivamente. Contudo, pode também ser utilizado o Etest® e o PCR para a detecção dos genes vanA ou vanB. Como essas cepas não foram enviadas ao LACEN-DF não se pode dizer se a resistência à vancomicina é verdadeira ou meramente um erro da automação.

Analisando somente as *S. aureus* sensíveis à oxacilina (MSSA) (Figura 4) ainda continuou elevada a taxa de resistência a penicilina (90,9%) que pode ser explicada já que 70% das cepas de *Staphylococcus* spp. são resistentes a penicilina (CATÃO et al., 2013). A taxa de resistência encontrada para penicilina foi maior do que a encontrada em um estudo realizado na Paraíba por Catão e colaboradores (2013) entre 2009 e 2011 (44,44%), entretanto foi encontrada a mesma sensibilidade para oxacilina e gentamicina (CATÃO et al., 2013).

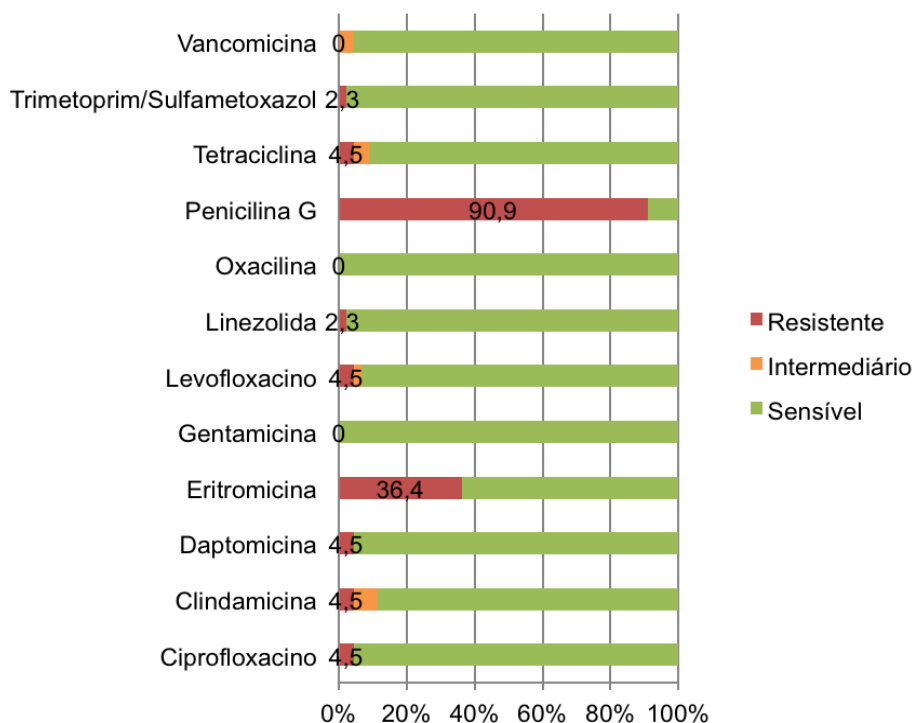


Figura 4 - Perfil de susceptibilidade de MSSA

O perfil de susceptibilidade de MRSA (Figura 5) apresentou taxa de resistência de 100% para penicilina, oxacilina e norfloxacina, 96,4% para eritromicina, 94% para ciprofloxacino e levofloxacino e 91,7% para clindamicina e

menor resistência para vancomicina (3,6%), linezolida e daptomicina (4,8%), tetraciclina (8,3%) e trimetropim/sulfametoxazol (13,1%). O estudo realizado na Paraíba apresentou a mesma resistência para penicilina e oxacilina, uma taxa menor de resistência para eritomicina, ciprofloxacino e clindamicina (82,35%) e vancomicina que apresentou sensibilidade de 100%, entretanto, apresentou uma resistência maior para tetraciclina (58,82%) e trimetropim/sulfametoxazol (64,70%) (CATÃO et al., 2013).

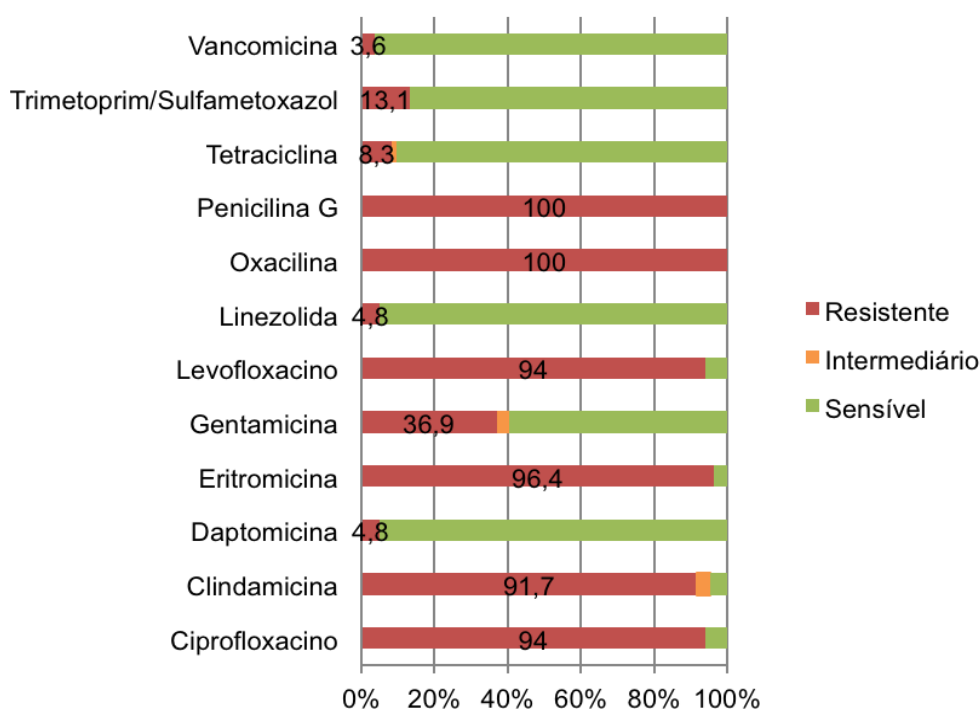


Figura 5- Perfil de susceptibilidade de MRSA

Outro estudo realizado por Gales e colaboradores (2009) analisou amostras dos hospitais das regiões sul, centro-oeste, sudeste nos anos de 2005 e 2008 e ao comparar com os dados obtidos nesse estudo, houve uma semelhança dos resultados para a eritromicina que apresentou 94%; clindamicina, 87,9%; ciprofloxacino, 91,4%; levofloxacino, 90,2% (GALES et al., 2009).

Ao analisar o perfil de susceptibilidade de *K. pneumoniae*, foi possível verificar que esta cepa apresentou as maiores taxas de resistência para os seguintes antimicrobianos: aztreonam, cefepima e cefotaxima (75, 2%) e ertapenem (69,7%) e a menor taxa de resistência foi de 2,6% para amicacina (Figura 6).

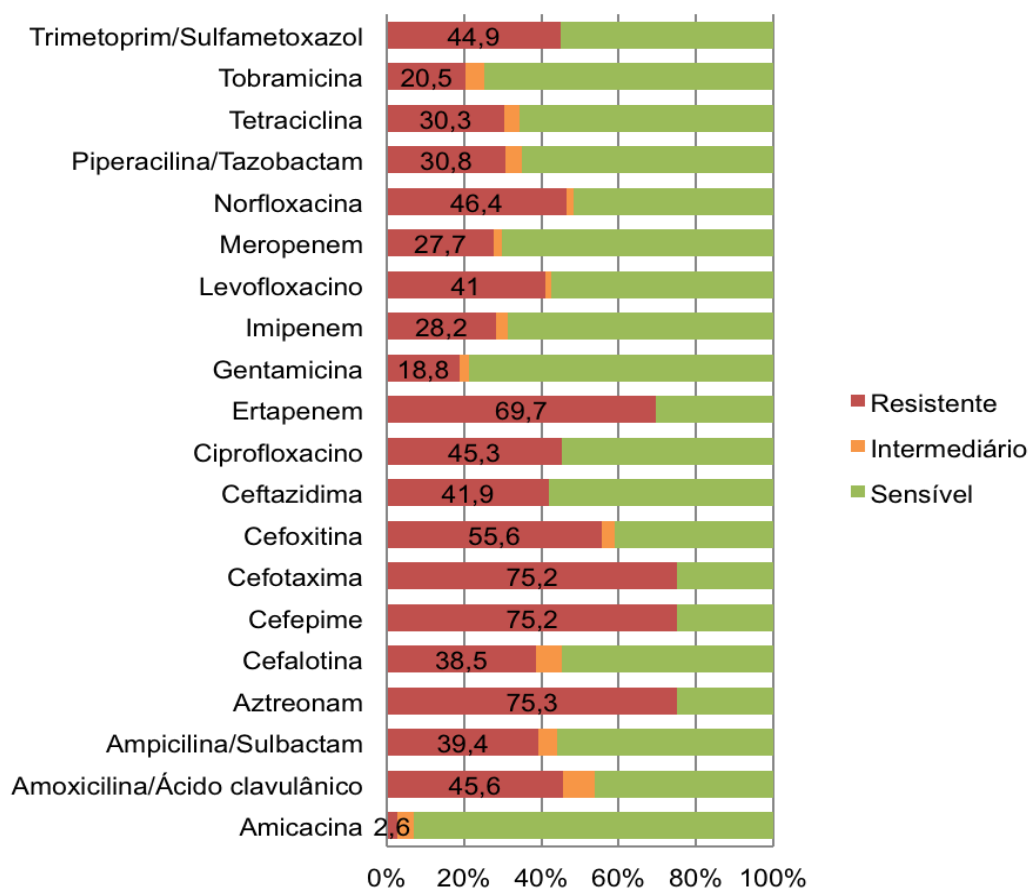


Figura 6 - Perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae*

Em comparação a um estudo realizado na América Latina (Argentina, Brasil, Chile e México) de 2008 a 2010, o perfil de susceptibilidade analisado neste estudo apresentou mais resistência, principalmente se comparado o imipenem e meropenem, que apresentaram resistência por volta de 6% e cefepime 36%. Entretanto, a resistência encontrada para amicacina e gentamicina neste estudo foi menor do que a encontrada na América Latina, 7,8% e 33%, respectivamente (GALES et al.,2012). E ao comparar com o ano de 2011, em um Hospital Universitário em Londrina, o perfil encontrado neste estudo demonstrou uma frequência de resistência para ertapenem de 40% e cefotaxima, cefepima e aztreonam apresentaram uma frequência de resistência de 60% (ROSSI et al., 2015).

O *A. baumannii* apresentou o perfil de susceptibilidade mais preocupante, tendo uma frequência de resistência de 100% ao imipenem; 91,1%, a ciprofloxacino,

ceftazidima e cefotaxima; 88,8%, a cefepime; 86%, ao meropenem; 82,2, a levofloxacina; entre outros (Figura 7).

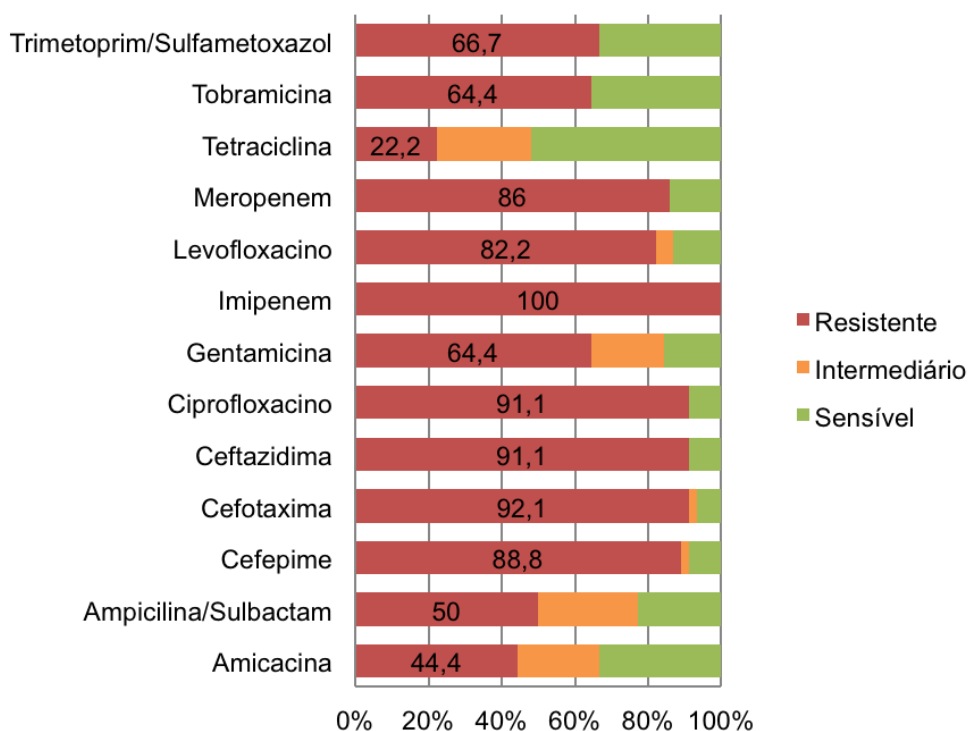


Figura 7 - Perfil de susceptibilidade de *Acinetobacter baumannii*

Essa bactéria possui uma facilidade no desenvolvimento da resistência, nos anos 90, a maioria das cepas era sensível às quinolonas e aos carbapenems e nos últimos anos foram relatados vários surtos de *A. baumannii* multirresistente (OGUTLU et al., 2014). Por exemplo, ao comparar dois estudos realizados pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY no Brasil, em 2001 e 2010, houve diminuição na susceptibilidade principalmente do imipenem, que passou de 97,8% para 27%, e meropenem, que passou de 96,7% para 27,3% (SADER et al., 2004; GALES et al., 2012). Comparando a taxa de resistência entre os antimicrobianos testados neste trabalho e os do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY entre 2008 e 2010, o perfil de susceptibilidade apresentou uma frequência de resistência maior, com exceção da amicacina que foi de 62,6%. Os antimicrobianos levofloxacino, cefotaxima, trimetoprim/sulfametaxazol, tetraciclina e ampicilina/sulbactam não foram testados (GALES et al., 2012).

As taxas mais altas de resistência para *P. aeruginosa* foram 54,3% para ciprofloxacino; 53,1%, para levofloxacino e imipenem; e 47%, para norfloxacino (Figura 8). Em um estudo realizado na Bahia, por Assis e colaboradores em 2012, 66% das cepas foram resistentes a levofloxacino; 51%, a amicacina; e 34%, ao meropenem (ASSIS et al., 2013). Na América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, México, Panamá, Peru e Venezuela), 44,9% foram resistentes a imipenem; 38,4%, a meropenem; 38,2%, a levofloxacino; e 20,5% a amicacina (JONES et al., 2013).

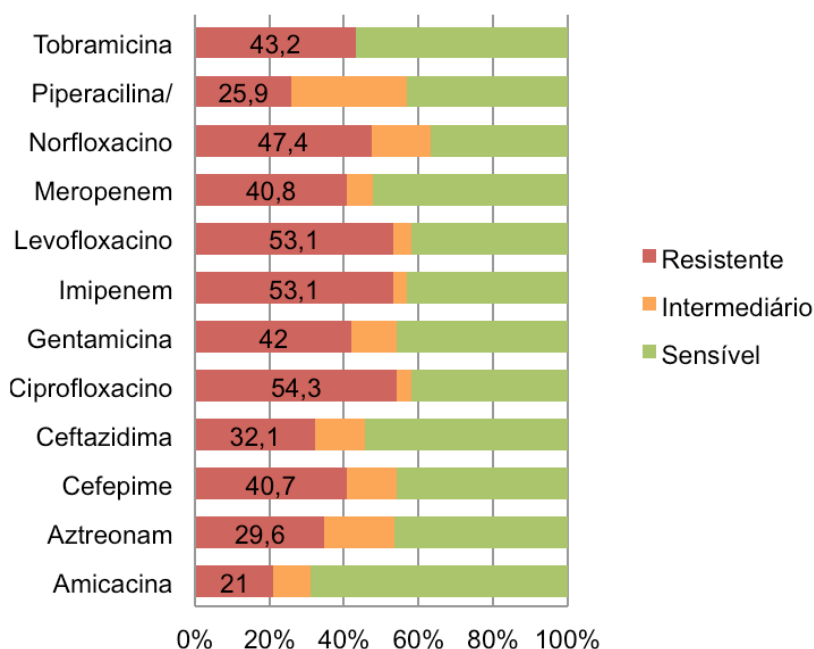


Figura 8 - Perfil de susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*

As maiores taxas de resistência para *Enterobacter spp.* foram para cefalotina (96%), amoxicilina/ácido clavulânico (87,5%), ceftaxima (79,2%), ampicilina (78,5%) e cefotaxima (73,9%) (Figura 9). Em um estudo feito em Rondônia, em 2010, as maiores taxas foram para os seguintes antibióticos: cefotaxima (75%), aztreonam (72,7%) e amoxicilina/ácido clavulânico (66,7%). Não foram testados cefalotina, ceftaxima e ampicilina (GRILLO et al., 2013).

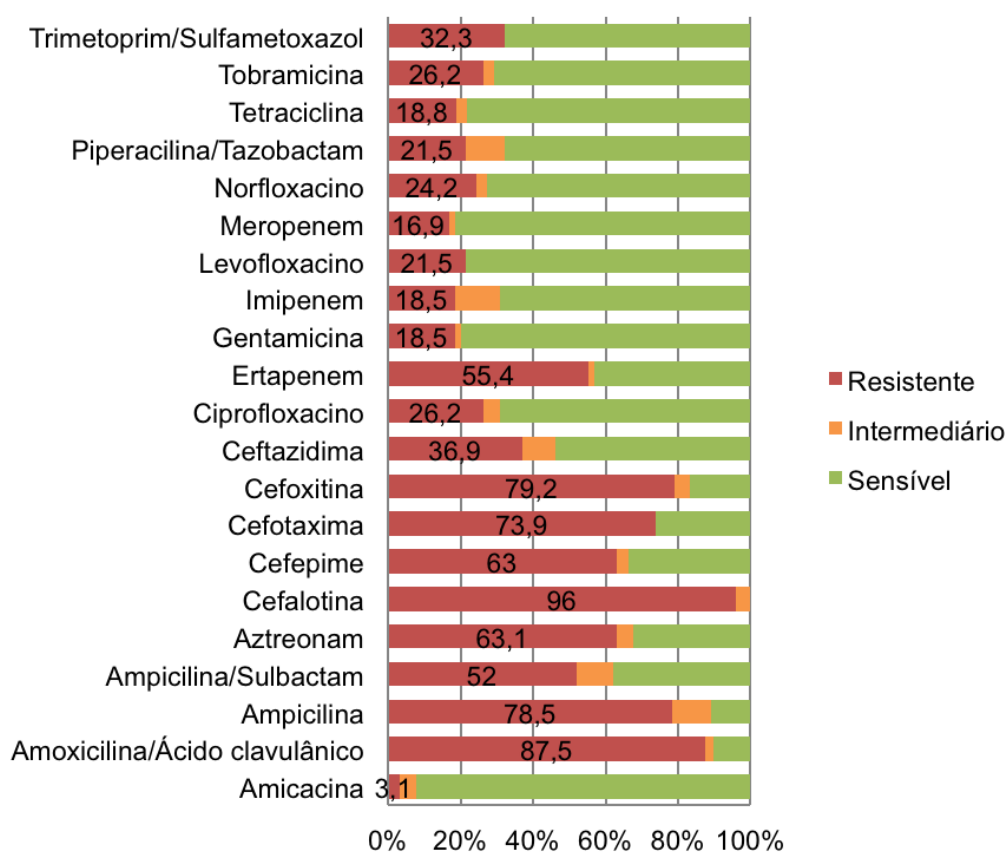


Figura 9 - Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter spp.*

5.5 Detecção molecular dos genes por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

O gene bla_{KPC} (Figura 10) foi encontrado em 4 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, sendo uma amostra swab retal e três amostras urina. Em 2001 foi feito o primeiro relato de KPC em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada em 1996, na Carolina do Norte, Estados Unidos (YIGIT et al. 2001; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Já o primeiro relato no Brasil, foi em 2009, após a descoberta do gene em cepas coletadas em 2006 em um paciente de uma unidade de cuidado intensivo em um Hospital terciário de Recife (MONTEIRO et al., 2009). E em 2010 foram feitas 187 notificações de infecção por cepas produtoras de KPC no Distrito Federal, havendo nesse ano 18 óbitos identificados (FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

O gene bla_{NDM} foi encontrado em três amostras de swab retal positivas para *K. pneumoniae* (Figura 10). Esse gene que codifica a carbapanemase NDM-1 foi

descrito pela primeira vez em 2009, em um paciente sueco que havia viajado para Nova Deli, na Índia, e adquiriu uma infecção do trato urinário causada por *K. pneumoniae* resistente a todos os β -lactâmicos, sendo sensível somente à colistina (YOUNG et al., 2009). Em 2013 foi relatado pela primeira a presença do gene em uma cepa de *Providencia rettgeri* de um paciente do hospital do Rio Grande do Sul e no Distrito Federal, no mesmo ano, também foi encontrado o gene em outra cepa de *Providencia rettgeri* em um paciente que não relatou viagem nos seis anos anteriores (CARVALHO et al., 2013; FARIA JUNIOR et al., 2013).

O gene bla_{OXA-23} foi encontrado em uma cepa de *Acinetobacter baumannii* isolada de uma cultura de fragmento de tecido (Figura 10). A primeira descrição de OXA-23 foi na escócia em 1985 em um isolado de *A. baumannii* antes da utilização dos carbapenems e no Brasil foi encontrado em isolados de *A. baumannii* em dois hospitais terciários de Curitiba (Dalla-Costa et al., 2003; DONALD et al., 2000; SCAIFE et al., 1995).

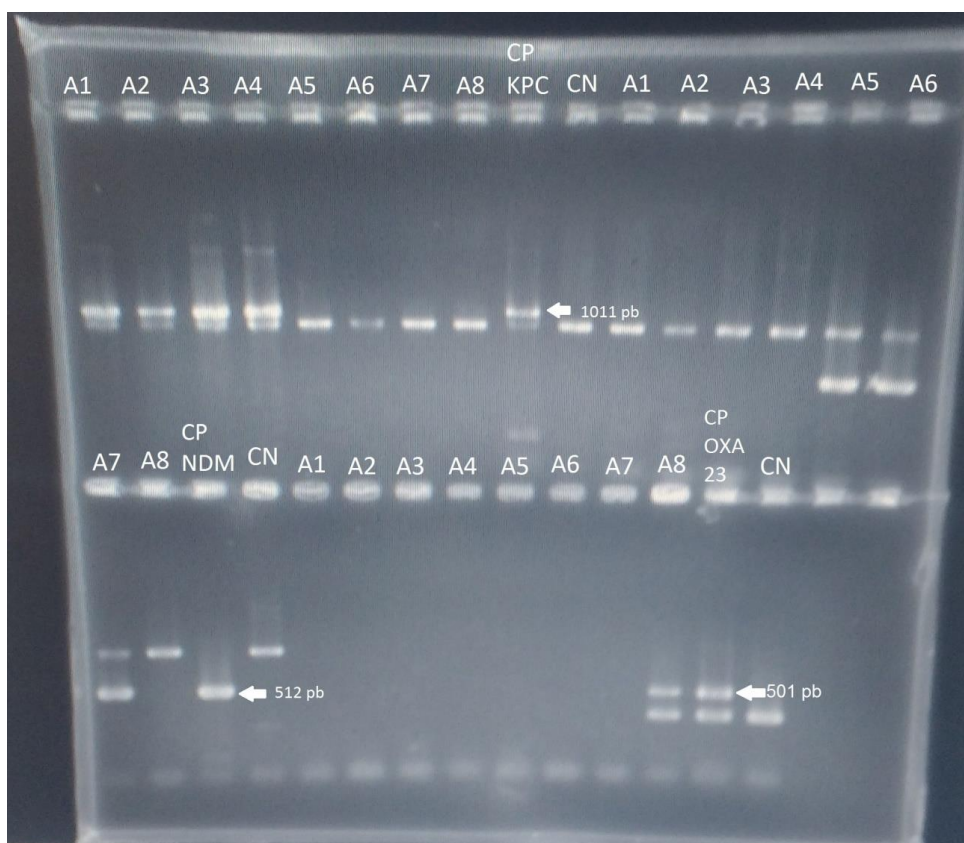


Figura 10 - Corrida de gel da PCR para pesquisa de KPC, NDM e OXA-23. Legenda: A1: amostra 1; A2: amostra 2; A3: amostra 3; A4: amostra 4; A5: amostra 5; A6: amostra 6; A7: amostra 7; A8: amostra 8; CP KPC: controle positivo para KPC; CP NDM: controle positivo para NDM; CP OXA 23: controle positivo para OXA-23; CN: controle negativo; pb: pares de bases.

Apesar de nenhuma amostra ter dado positivo pra enzima IMP e VIM, essas enzimas podem ser encontradas em enterobactérias e gram-negativos não fermentadores, principalmente *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011).

É importante ressaltar que o hospital estudado é considerado de pequeno porte e foram encontradas cepas que apresentam um perfil de resistência preocupante. Essa resistência não é específica do hospital analisado, uma vez que grande parte dos pacientes é advinda de outros hospitais da Rede Pública de Saúde do DF e já chegam, portando, colonizados ou com infecção por microrganismos multirresistentes (MDR).

Caso não sejam aplicadas medidas para o controle de MDR estima-se que em 2050 a cada 3 segundos uma pessoa será morta devido à resistência bacteriana (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016). O Brasil deu um passo quando proibiu a venda de antimicrobianos sem receita através da RDC 44/2010 que foi substituída pela RDC 20/2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), diminuindo o seu uso irracional (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011). Entretanto, muitos profissionais ainda prescrevem antimicrobianos sem ter necessidade ou então prescrevem antimicrobianos de amplo espectro enquanto os de primeira escolha são eficazes. E também há o uso desnecessário de antimicrobianos na pecuária.

6 CONCLUSÃO

Estudos como este são importantes, pois levantam dados do hospital, uma vez que cada um possui peculiaridades específicas, devendo ser realizados com periodicidade para analisar as taxas de resistência bacteriana de cepas circulantes no hospital. Os resultados desses estudos podem ser utilizados para nortear a escolha do esquema terapêutico, entretanto, esses dados não excluem a realização de um antibiograma para cada paciente.

É necessário que haja uma maior interação da CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) com médicos e enfermeiros, ressaltando toda a importância do cuidado ao paciente de modo a evitar a propagação de cepas MDRs, uma vez que se observa que ainda há profissionais despreparados. O farmacêutico pode atuar nessa área como membro da CCIH, microbiologista do laboratório e também na farmácia, exigindo o antibiograma para a dispensação do antimicrobiano, levando a uma maior restrição na prescrição de antimicrobianos, principalmente os que são utilizados como última escolha.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial. Multidrug Resistance. **Cell** 128 (6): 1037-1050, 2007.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Front Microbiol.** 1(134): 1-7, 2010.

ASSIS, D. A. M.; OLIVEIRA, F. C. S.; COSTA, G. B.; BORGES, M. H. S. B.; MACEDO, P. C.; AQUINO JUNIOR, C. N.; ROMANO, C. C. Prevalência e susceptibilidade de bactérias do grupo ESKAPE nas diversas infecções em pacientes do CTI de um hospital no sul da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 27., 2011, Natal. Resumos... [São Paulo]: Sociedade Brasileira de Microbiologia. Seção Resumos, ref. 792-2, 2011.

BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Evolutionary biology of drug resistance .In: Mayers DL, Lerner SA, Ouelette M et al., eds. **Antimicrobial Drug Resistance**. New York: Humana Press. 9-32, 2009.

BARRERO, L. I.; CASTILLO, J. S.; LEAL, A. L.; SÁNCHEZ, R.; CORTÉS, J. A.; ÁLVAREZ, C. A.; GONZÁLEZ, A. L. Impacto económico de la resistencia a la meticilina en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Bogotá. **Biomédica.** 34(3): 345-353, 2014.

BASSETT, E. J.; KEITH, M. S.; ARMELAGOS, G. J.; MARTIN, D. L.; VILLANUEVA, A. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). **Science** 209:1532–1534, 1980.

BOUCHER H. W.; TALBOT G. H.; BRADLEY J. S.; EDWARDS J. E.; GILBERT D.; RICE L. B.; SCHELD M.; SPELLBERG B.; BARTLETT J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** 48(1): 1–12, 2009.

BOUCHER, H. W.; G. R. Corey. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.** 46(5): 344–349, 2008.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 20, de 5 de maio de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 maio 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 44, de 26 de outubro de 2010. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 2010.

BUSH, K. Why it is important to continue antibacterial drug discovery. **ASM News**.70: 282-287, 2004.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; CHAGAS, T. P. G.; TIMM, L. N.; SILVA, R. C. F.; FALCI, D. R.; ASENSI, M.D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother.** 68: 2956–2957, 2013.

CATÃO, R. M. R.; FREITAS E SILVA, P. M.; FEITOSA, R. J. P; PIMENTEL, M. C.; PEREIRA, H. S. Prevalence of hospital-acquired infections caused by *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile. **J Nurs UFPE on line**.7(6):5257-5264, 2013.

CHAGAS, T. P.; CARVALHO, K. R.; SANTOS, I. C. O.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; ASENSI, M. D. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagn Microbiol Infect Dis.** 79:468–472, 2014.

CHAGAS, T. P.G.; SILVEIRA, M. C.; ALBANO, R. M.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**110(5): 691-692, 2015.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement.** CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, C. C. H. B.; SILVA, P. R.; ÁVILA, B. G. M.; OLIVEIRA, A. G. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. **Rev Soc Bras Med Trop.** 44(2): 177-181, 2011.

CORNAGLIA, M.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **Lancet Infect Dis.**11: 381–933, 2011.

CORTIVO, G. D.; GUTBERLET, A.; FERREIRA, J. A.; FERREIRA, L. E.; DEGLMANN, R. C.; WESTPHAL, G. A.; FRANÇA, P. H. C. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, **Brazil Rev Soc Bras Med Trop.** 48(6): 699-705, 2015.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int J Med Microbiol.** 303: 287– 292, 2013.

DALLA COSTA, L. M.; SOUZA, D. C.; MARTINS, L. T.; ZANELLA, R. C.; BRANDILONE, M. C.; BOKERMANN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **Braz. J. Infect Dis.** 2(3):160-163, 1998.

DALLA-COSTA, L. M.; COELHO, J. M.; SOUZA, H. A. P. H. M.; CASTRO, M. E. S.; STIER, C. J. N.; BRAGAGNOLO, K. L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S. R.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol.** 41(7): 3403–3406, 2003.

DAVIES, J. Where have all the antibiotics gone? **Can J Infect Dis Med Microbiol.** 17(5): 287-290, 2006.

DEMAIN, A.L.; SPIZEK, J. The antibiotic crisis. In: Tegos, G.; Mylonakis, E. (eds) **Antimicrobial drug discovery: emerging strategies.** CAB International, Wallingford, UK : 26–43, 2012.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S., MENEZES, M. F. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Clínica farmacológica**, cadernos de otorrinolaringologia. Clínica, Investigação e Inovação. 1-11: 2010.

DONALD, H. M.; SCAIFE, W.; AMYES, S. G.; YOUNG, H. K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrob Agents Chemother**, 44(1): 196–199, 2000.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technol Biotech.** 46(1): 11-21, 2008.

ECHEVERRI TORO, L. M.; CATAÑO CORREA, J. C. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. **Iatreia.** 23(3): 240-249, 2010.

FALKINHAM, J. O.; WALL, T. E.; TANNER, J. R.; TAWAHA, K.; ALALI, F. Q.; LI, C.; OBERLIES, N. H. Proliferation of Antibiotic-Producing Bacteria and Concomitant Antibiotic Production as the Basis for the Antibiotic Activity of Jordan's Red Soils . **Appl Environ Microbiol.** 75(9): 2735–2741, 2009

FARIA JUNIOR, C.; RODRIGUES, L. O.; CARVALHO, J. O.; FRANCO, O. L.; PEREIRA, A. L.; BRASILIA STUDY GROUP ON BACTERIAL RESISTANCE. NDM-Producing Enterobacteriaceae Strains among Hospitals in Brasília, Brazil. **J Microbiol Exp.** 3(2), 2016.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase: UM PROBLEMA SEM SOLUÇÃO? **Braz J Surg Clin Res.** 9(1): 45-48, 2015.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagn Microbiol Infect Dis.** 73: 354–360, 2012.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005–2008). **Braz J Infect Dis.** 13:90-8, 2009.

GAVAZZI, G.; KRAUSE, K.H. Ageing and infection. **Lancet Infect Dis.** 2:659–666, 2002.

GISKE, C. G.; GEZELIUS, L.; SAMUELSEN, Ø.; WARNER, M.; SUNDSFJORD, A.; WOODFORD, N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-bactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infec.** 17(4): 552-556, 2011.

GHOSH, A. N.; BHATTA, D. R.; ANSARI, M. T.; TIWARI, H. K.; MATHURIA, J. P.; GAUR, A.; SUPRAM, H. S.; GOKHALE, S. Application of WHONET in the Antimicrobial Resistance Surveillance of Uropathogens: A First User Experience from Nepal. **J Clin Diagn Res.** 7(5):845–848, 2013.

GOLD, H. S. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. **Clin Infect Dis.** 33:210-219, 2001.

GORWITZ, R. J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S. K.; MCQUILLAN, G.; MCDUGAL, L. K.; FOSHEIM, G. E.; JENSEN, B. J.; KILLGORE, G.; TENOVER, F. C.; KUEHNERT, M. J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **J Infect Dis.** 97:1226–34, 2008

GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL. Secretária Do Estado de Saúde do Distrito Federal. Manual de prevenção e controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Brasília: Secretaria de saúde do Distrito Federal, 91p, 2014

GRILLO, V. T. R. S., GONÇALVES, T. G., CAMPOS JÚNIOR, J., PANIÁGUA, N. C., TELES, C. B. G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, 34(1): 117-123, 2013.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, D. S.; PUPO, M. P. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e Desenvolvimento de novos agentes. **Quim Nova.** 33(3): 667-679, 2010.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother.** 40:135-136, 1997.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infect Drug Resist.** 7:167–176, 2014.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg Infect Dis.** 4(2):239-49, 1998.

JEVONS, M. P.; COE, A. W.; PARKER, M. T. Methicillin resistance in staphylococci. **Lancet**.1:904–7, 1963

JONES, R. N.; GUZMAN-BLANCO, M.; GALES, A. C.; GALLEGOS, B.; CASTRO, A. L. L.; MARTINO, M. D. V.; VEGA, S.; ZURITA, J.; CEPPARULO, M.; CASTANHEIRA, M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **Braz J Infect Dis** . 17(6): 672-681, 2013.

KALSI J, ARYA M, WILSON P, MUNDY A. Hospital-acquired urinary tract infection. **Int J Clin Pract**. 57:388-391, 2003.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pac J Trop Biomed**. 5(7): 509–514, 2015

LEWIS,K. Platforms for antibiotic Discovery. **Nat Rev Drug Discov**. 12 (5): 371–387, 2013.

MARTÍN, R.; MIQUEL, S.; ULMER J.; KECHAOU, N.; LANGELLA, P.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. **Microb Cell Fact**. 12:71, 2013.

MCDEVITT, D.; ROSENBERG, M. Exploiting genomics to discover new antibiotics. **Trends Microbiol**. 9(12): 611–617, 2001.

MONACO, M.; ARAUJO, F. P.; CRUCIANI, M.; COCCIA, E. M.; PANTOSTI, A. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 1-36, 2016.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. 53(1), 333–334, 2009.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Bras Patol Med Lab.** 47(4):409-420, 2011.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Med Mal Infect.** 44(2): 51-56, 2014.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends Mol Med.** 18(5): 263-272, 2012.

OGUTLU, A.; GUCLU, E.; KARABAY, O.; UTKU, A. C.; TUNA, N.; YAHYAOGU, M. Effects of Carbapenem consumption on the prevalence of Acinetobacter infection in intensive care unit patients. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** 13: 7, 2014.

OLIVEIRA, A. C., GONZAGA, C., COSTA, R., DAMACENO, Q. S., GARBACCIO, J. L. Desafios e perspectivas para a contenção da resistência bacteriana na óptica dos profissionais de saúde. **Rev Eletr Enf.** 15(3): 747-754, 2013.

OLIVEIRA, C. B. S.; DANTAS, V. C. R.; NETO, R. M.; AZEVEDO, P. P. M.; MELO, M. C. N. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **J Bras Patol Med Lab.** 47(6): 589-594, 2011.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules.** 20: 5286-5298, 2015.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol.**300(6):371-379, 2010.

PIRES, F. V.; CUNHA, M. L. R. S.; ABRAÃO, L. M.; MARTINS, P. Y. F.; CAMARGO, C. H.; FORTALEZA, C. M. C. B. (2014). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey. **PLoS ONE**. 9(3): 1-7.

POLOTTO, M., CASELLA, T., DE LUCCA OLIVEIRA, M. G., RÚBIO, F. G., NOGUEIRA, M. L., DE ALMEIDA, M. T., & NOGUEIRA, M. C. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis** 12(176): 1-8, 2012.

RAVI, A.; AVERSHINA, E.; LUDVIGSEN, J.; L'ABÉE-LUND, T. M.; RUDI, K. Integrons in the Intestinal Microbiota as Reservoirs for Transmission of Antibiotic Resistance Genes. **Pathogens**. 3: 238-248, 2014.

REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, 2016. Disponível em: <http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em 22 maio 2016.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**. 197:1079–81, 2008.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A. ; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **Int J Med Microbiol**. 303: 293– 297, 2013.

RORIZ-FILHO JS, VILAR FC, MOTA LM, LEAL CL, PISI PCB. Infecção do trato urinário. *Medicina (Ribeirão Preto Online)*. 43(2): 118-125, 2010.

ROSA, R.G.; SCHWARZBOLD, A. V.; SANTOS, R. P.; TURRA, E. E; MACHADO, D. P.; GOLDANI, L. Z. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Bacteremia in a

Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Antimicrobial Susceptibility, and Outcome. **BioMed Research International**. 1-6, 2014.

ROSSI, D. J.; RECHENCHOSKI, D. Z.; VIVAN, A. C. P. ; DAMBRÓZIO, A. M. L.; GARBIN, R. P. B ; MAGALHÃES, G. L. G.; QUESADA, R. M. B.; MARRONI, F. E. C.; PELISSON, M.; PERUGINI, M. R. E.; CAROLINA, E. Evolução da resistência de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Universitário de Londrina no período de 2000 a 2011. **Semina cienc biol saude**. 36(1): 267-274, 2015.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**. 8(1): 25-79, 2004.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends Microbiol**. 12(9): 412-416, 2004.

SCAIFE, W.; YOUNG, H. K.; PATON, R. H.; AMYES, S. G. Transferable imipenemresistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob chemother*. 36(3): 585–586, 1995.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. **Biochem Pharmacol**. 71: 1006 – 1015, 2006.

UTTLEY, A. H. C.; COLLINS, C. H.; NAIDOO, J.; GEORGE, R. C. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet** 1988;1:57-8.

VERRAES, C.; VAN BOXSTAEL, S.; VAN MEERVENNE, E.; VAN COILLIE, E.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; SCHAETZEN, M.A.; VAN HUFFEL, X.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K.; DAUBE, G.; SAEGERMAN ,C.; DE BLOCK, J.; DEWULF, J.; HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **Int J Environ Res Public Health** 10(7): 2643-69, 2013

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014. Disponível em:<
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>.

Acesso em 4 mar 2015.

WIELDERS, C. L. C.; FLUIT, A. C., BRISSE, S.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. *mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population. **J Clin Microbiol.**40(11): 3970-3975, 2002.

WOOLHOUSE, M.; WARD, M.; BUNNIK, B. van; FARRAR, J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. **Phil Trans R Soc B.** 370(1670), 2015.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(4):1151-1161, 2001.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a New Metallo--Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.** 53 (12): 5046–5054, 2009.

ANEXO 1 - Documento de aprovação do comitê de ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de resistência de microrganismos causadores de infecções oportunistas, nosocomiais e assintomáticas na Regional de Ceilândia/DF

Pesquisador: Thaís Alves da Costa Lamounier

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 38856114.0.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ceilândia - FUNDACAO UNIVERSIDADE DE BRASILIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.079.971

Data da Relatoria: 10/06/2015

Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo avaliar o perfil destes microrganismos com relação a resistência microbiana e análises moleculares na Regional de Saúde da Ceilândia no Distrito Federal. Estes dados poderão contribuir para o perfil epidemiológico de bactérias e leveduras que possam gerar quadros de morbidade e até mortalidade em determinados grupos de pacientes.

As amostras recebidas para a realização dos exames laboratoriais no Laboratório Regional da Ceilândia e no Laboratório do Hospital Regional da Ceilândia serão processadas de acordo com as rotinas laboratoriais baseadas nos Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) internos e as Normas de Biossegurança. As cepas de bactérias e leveduras isoladas serão identificadas pelo método automatizado e será realizado o antibiograma para as cepas bacterianas de acordo com os padrões estabelecidos pela NCCLS. Para as leveduras não será realizado o antifungigrama. Para isso, será aplicado o Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (TCLE), conforme modelo em ANEXO. Após a identificação das espécies, as colônias isoladas serão selecionadas para que, a partir dos inóculos obtidos de cada colônia, seja extraído o material genéticos dos microrganismos. Após a extração utilizando kits comerciais, o DNA será submetido às técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e qRT-PCR (Real Time PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para cada cepa de microrganismo. Os oligonucleotídeos serão definidos para regiões

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.079.971

gênicas de resistência microbiana. As amostras serão analisadas em gel de agarose 1%. Além disso, será utilizado o programa WHONET como ferramenta para a análise de microrganismos já identificados e foram inseridos no sistema. O WHONET é um software de banco de dados desenvolvido para gestão e análises dos dados obtidos nos laboratórios de Microbiologia, com ênfase na análise de resultados de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Este é utilizado em mais de 90 países para contribuir com programas nacionais de vigilância, bem como apoiar a decisão clínica e política de utilização de antibióticos, detectar surtos, identificar o desempenho dos testes realizados no laboratório e caracterizar o perfil microbiano isolado. O Laboratório Regional da Ceilândia dispõe desta ferramenta. Assim, no presente estudo será possível realizar a análise do perfil e da resistência antimicrobiana das bactérias que já foram isoladas na cidade da Ceilândia/DF.

Critério de Inclusão:

Serão incluídas no projeto as amostras de urina, secreção vaginal, secreção de orofaringe, ponta de cateter, líquidos corporais, hemocultura ou qualquer outro material biológico em que houver isolamento de microrganismos.

Critério de Exclusão:

Amostras consideradas negativas serão excluídas da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

Avaliar o perfil de resistência de microrganismos, como bactérias e leveduras, causadoras de infecções em diferentes sítios biológicos de amostras processadas no Laboratório Regional da Ceilândia.

Objetivo Secundário:

- Analisar as principais espécies de bactérias e leveduras causadoras de infecções assintomáticas, nosocomiais e ambulatoriais no Laboratório Regional da Ceilândia.
- Realizar técnicas moleculares de PCR convencional e PCR em tempo Real para avaliação do perfil de resistência antimicrobiana.
- Realizar análise estatísticas dos antimicrobianos sensíveis e resistentes das cepas analisadas com o auxílio do programa WHONET."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios, segundo o pesquisador:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.910-900
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947	E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.079.971

"Riscos:

Não existem riscos iminentes de contaminação visto que as amostras serão processadas no Laboratório Regional da Ceilândia aonde já estão estabelecidas as normas de Biossegurança com a utilização de Equipamentos de Proteção Individual e Coletiva.

Benefícios:

Contribuir com informações clínicas e epidemiológicas sobre o perfil microbiano, bem como a utilização de antimicrobianos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trata de projeto de TCC apresentado pela orientadora para futura realização por aluno de graduação.

Critério de Inclusão: Serão incluídas no projeto as amostras de urina, secreção vaginal, secreção de orofaringe, ponta de cateter, líquidos corporais, hemocultura ou qualquer outro material biológico em que houver isolamento de microrganismos.

Critério de Exclusão: Amostras consideradas negativas serão excluídas da pesquisa.

As amostras serão provenientes de 100 participantes de pesquisa atendidos no Laboratório Regional da Ceilândia e no Laboratório do Hospital Regional da Ceilândia que se apresentarem para a realização dos exames laboratoriais.

Os usuários que levarem suas amostras ao laboratório serão convidados a participar pelos pesquisadores envolvidos. O Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (TCLE) será aplicado pela equipe envolvida na pesquisa (estudantes de TCC, PIBIC e pela própria pesquisadora).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados em atendimento às pendências apontadas no parecer No. 1.061.262:

Carta em resposta às pendências apontadas pelo CEP - "Resposta Pendencia Maio 2015.pdf", postado em 18/05/2015;

Informações Básicas do Projeto - "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_414958.pdf", postado em 18/05/2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A Secretaria de Saúde foi incluída como instituição coparticipante vinculada ao CEP-FEPECS/SES-DF.
PENDÊNCIA ATENDIDA

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: ceptsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.079.971

Não há mais pendências.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Resolução CNS 466/2012 e complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A realização das atividades do projeto na instituição coparticipante está condicionada à aprovação pelo CEP responsável, o CEP-FEPECS/SES-DF.

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

BRASILIA, 26 de Maio de 2015

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com