

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE
MESTRADO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE

Betina Brixner

INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA: epidemiologia e diagnóstico molecular

Santa Cruz do Sul

2019

Betina Brixner

INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA: epidemiologia e diagnóstico molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Área de Concentração em Promoção da Saúde, Linha de Pesquisa em Vigilância em Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Promoção da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jane Dagmar Pollo Renner

Santa Cruz do Sul

2019

Betina Brixner

INFECCÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA: epidemiologia e diagnóstico molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Área de Concentração em Promoção da Saúde, Linha de Pesquisa em Vigilância em Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Promoção da Saúde.

Banca Examinadora

Dr^a. Jane Dagmar Pollo Renner
Professora Orientadora – UNISC

Dr. Lia Gonçalves Possuelo.
Professor Examinador – UNISC

Dr. Luciana de Souza Nunes
Professor Examinador – UNIPAMPA

Santa Cruz do Sul

2019

Aos meus pais e minha irmã, pelo constante apoio e incentivo.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Jane Dagmar Pollo Renner, por acreditar em mim e no meu potencial. Agradeço por sempre estar disponível e disposta a me ajudar e, também, por me oportunizar vivências e aprendizados acadêmicos durante o mestrado. Te considero uma pessoa iluminada e especial, que além de orientadora sempre foi minha amiga e conselheira. Que esses nove anos amizade e parceria se perdue por muito tempo. Obrigada por tudo!

Aos demais professores e funcionários, que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos os bolsistas do bloco 55 e a Valéria Louzada Leal, pela amizade, companheirismo e ajuda nesses dois anos de pesquisa. Obrigada por todos os momentos, tristes e alegres, que tive o prazer de compartilhar com vocês.

Meu agradecimento, em especial, para a bolsista Nayanna Dias Bierhals, que me acompanhou desde o início dos experimentos. Tu foste meu “braço direito” e essencial para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

À equipe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Santa Cruz e ao Laboratório Santa Cruz, pelo fornecimento dos dados necessário para a realização da pesquisa epidemiológica.

Aos funcionários do TecnoUnisc e do laboratório de ensino (bloco 20) pelo auxílio e disponibilidade do espaço físico para a realização dos experimentos.

Aos meus colegas e professores do mestrado: obrigada por todo o conhecimento compartilhado e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, por todo o suporte prestado.

À Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, Pedro Miguel Brixner e Maria de Lourdes Brixner, por ter me dado educação e valores. Obrigada por acreditarem em mim! Tenho consciência de que nada disso seria possível sem o apoio e incentivo de vocês.

A minha irmã, Danielle Brixner, pela amizade e apoio constante.

Família: o amor incondicional de vocês me fortaleceu e fez com que eu desse o melhor de mim para a realização desse sonho. Essa conquista é nossa!

*As nuvens sempre passam. Podem ser claras ou
escuras, mas sempre passam. Talvez tenha que chover
uma tempestade, mas ela também passa. Compreenda
que você não é a nuvem, você é o céu.*

(SRI PREM BABA)

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas um problema de saúde pública, prejudicando o quadro clínico de pacientes e repercutindo diretamente nas altas taxas de morbimortalidade e aumento dos gastos hospitalares. Para identificar o agente patogênico responsável pelo processo infeccioso, muitos laboratórios utilizam as técnicas microbiológicas convencionais, conhecidas como “padrão-ouro”, porém a liberação do resultado dos exames é demorada. Com o intuito de agilizar os resultados e contribuir no desfecho clínico do paciente, as técnicas moleculares são consideradas promissoras, em que a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) tem se mostrado um método importante para auxiliar no rápido diagnóstico de bactérias patogênicas e seleção de antibioticoterapia adequada. Desta maneira, o objetivo desta dissertação foi realizar um levantamento epidemiológico das infecções da corrente sanguínea (ICS) nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do hospital em estudo, bem como desenvolver métodos de qPCR para discriminação molecular de Gram e de genes envolvidos na resistência antimicrobiana. No **Artigo I**, apresentam-se os resultados das ICS em pacientes internados na UTI neopediátrica, em que foi possível analisar o perfil epidemiológico, microbiológico e os distúrbios crônicos maternos e/ou complicações obstétricas. Realizou-se um estudo retrospectivo através do levantamento de pacientes neopediátricos (<1 ano de idade) com hemoculturas positivas, no ano de 2016. Foram analisados dados dos pacientes, da internação hospitalar e maternos, bem como a bactéria patogênica responsável pela ICS e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Dentre os resultados encontrados, 33 pacientes foram acometidos pela ICS, em que 66,7% eram do sexo feminino, 81,8% apresentavam faixa etária de 0-28 dias, 36,4% pesaram entre 1.501-2.500 gramas ao nascer e 72,7% nasceram com idade gestacional <34 semanas. Referente aos dados maternos, a idade média das mães foi de $27 \pm 7,3$ anos e 87,9% apresentavam algum distúrbio crônico ou intercorrência durante a gestação, resultando em partos prematuros ($p=0,012$). Nas 43 hemoculturas positivas, a bactéria mais associada a ICS foi o *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN), presente em 53,5% dos casos, sendo 82,6% resistentes à oxacilina. Por fim, observou-se que os recém-nascidos prematuros foram os mais acometidos pela ICS, em que a prematuridade foi associada com a presença de fator de risco materno. Além disso, o SCoN foi a bactéria mais isolada nas hemoculturas e apresentou alta resistência frente à oxacilina. Conhecer o perfil dos agentes patogênicos responsáveis pelas infecções é uma ferramenta importante para traçar planos e estratégias que visam garantir a sobrevivência dos pacientes internados. No **artigo II** são apresentados dados das ICS em UTI adulto, sendo

possível verificar os fatores de risco e os perfis epidemiológicos e microbiológicos. Foi realizado um levantamento de hemoculturas positivas em pacientes adultos (>14 anos) internados na UTI, no ano de 2016. Coletou-se informações do paciente, da internação hospitalar, da bactéria patogênica responsável pela ICS e seu mecanismo de resistência fenotípico. Dos 22 pacientes com hemoculturas positivas, 59,1% possuíam idade ≥ 60 anos, 54,5% eram do sexo masculino e 90,9% apresentavam histórico de comorbidades prévias, em que a doença cardíaca, em pacientes com diagnóstico de ICS, foi considerada um fator de risco para desfecho clínico desfavorável ($p=0,035$). Foram isolados SCoN em 54,2% hemoculturas e destes, 76,9% foram resistentes à oxacilina. A taxa de ICS foi baixa na população estudada, porém foi possível conhecer os perfis epidemiológicos e microbiológicos, auxiliando no monitoramento do controle de infecções e segurança do paciente. No **Artigo III** são apresentados os resultados das padronizações de qPCR, utilizando-se o sistema *TaqMan* para a discriminação molecular do Gram bacteriano. A qPCR Gram específica foi realizada, utilizando *primers* universais e *probes* específicas, em oito isolados clínicos e três cepas padrão. A sensibilidade analítica foi determinada através de diluições com quantidade de DNA de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* que variaram de 1 ng/ μ L a 1 pg/ μ L. A especificidade analítica das *probes* também foram testadas utilizando cepas padrão de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Com o sistema *TaqMan*, através da especificidade analítica, foi possível discriminar molecularmente todas as bactérias testadas pelo Gram, havendo emissão de fluorescência nas amostras Gram positivas e negativas para as suas respectivas *probes*; para amostras de fungos, não houve amplificação. Quanto a sensibilidade analítica, observou-se que o limite de detecção de DNA para *S. aureus* e *E. coli* foi de 10 pg/ μ L, em que a eficiência foi de 93,055 ($R^2= 0,99$) e de 69,592 ($R^2= 0,998$), respectivamente. Sendo assim, foi possível padronizar reações de qPCR *TaqMan* Gram específica, a qual obteve-se eficiência satisfatória nos ensaios de especificidade e sensibilidade analítica. No **Artigo IV** são apresentados os resultados das padronizações de qPCR, utilizando-se o fluoróforo o *Syber Green* para a detecção de genes envolvidos na resistência bacteriana. Foram testados *primers* em reações *uniplex* para dois genes de resistência de bactérias Gram positivas (*bla_{mecA}* e *bla_{vanA}*) e sete genes resistência em bactérias Gram negativas, em que quatro deles foram testados em reação *uniplex* (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*) e três em reação *multiplex* (*bla_{IMP}*, *bla_{SPM}* e *bla_{NDM}*). Através desta técnica, foi possível detectar a presença de genes de resistência estudados, cujos resultados expressos pela temperatura de *melting* (T_m) foram: *bla_{mecA}* (75,7 °C), *bla_{vanA}* (85,3 °C), *bla_{CTX-M}* (88,9 °C), *bla_{SHV}* (91,2 °C) *bla_{TEM}* (85,5 °C), *bla_{IMP}* (81,3 °C), *bla_{SPM}* (84,1 °C), *bla_{VIM}* (87,3 °C), *bla_{KPC}* (89,8 °C) e *bla_{NDM}* (89,3 °C). Sendo assim, foi

possível padronizar reações, *uniplex* e *multiplex*, para detecção genes envolvidos na resistência antimicrobiana utilizando o fluoróforo o *Syber Green*. Estas podem ser consideradas reprodutíveis e importantes para auxiliar na escolha da antibioticoterapia adequada.

Palavras-chave: Técnicas de Diagnóstico Molecular; Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real; Bacteremia; Infecções por Bactérias Gram-Positivas; Infecções por Bactérias Gram-Negativas; Genes Bacterianos; Genes MDR

ABSTRACT

Health Care-Related Infections (HAIs) are considered a public health problem, damaging the clinical situation of patients and directly affecting the high rates of morbidity and mortality and increased hospital expenses. To identify the pathogen responsible for the infectious process, many laboratories use conventional microbiological techniques, known as the "gold standard", but the release of test results is time-consuming. In order to speed up the results and contribute to the patient's clinical outcome, molecular techniques are considered promising, in which real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) has been shown to be an important method to aid in the rapid diagnosis of pathogenic bacteria and selection of appropriate antibiotic therapy. In this way, the objective of this dissertation was to conduct an epidemiological survey of bloodstream infections (BSI) in the Intensive Care Units (ICU) of the hospital under study, as well as to develop real-time PCR methods for molecular discrimination of Gram and genes involved in antimicrobial resistance. **Article I** presents the results of the BSI in patients hospitalized in the neopediatric ICU, in which it was possible to analyze the epidemiological, microbiological profile and the maternal chronic disorders and/or obstetric complications. A retrospective study was carried out through the survey of the neopediatric patient (<1 year of age) with positive blood cultures was carried out in 2016. Patient, hospital and maternal data, as well as the pathogenic bacterium responsible for BSI and the antimicrobial susceptibility profile. Among the results found, 33 patients were affected by BSI, in which 66.7% were female, 81.8% were between 0-28 days old, 36.4% were between 3.309-5.512 pounds at birth and 72.7% were born with gestational age <34 weeks. Regarding maternal data, the mean age of the mothers was 27 ± 7.3 years and 87.9% had some chronic disorder or intercurrent during gestation, resulting in premature births ($p= 0.012$). In the 43 positive blood cultures, the bacterium most associated with BSI was coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS), present in 53.5% of the cases, being 82.6% resistant to oxacillin. Finally, it was observed that preterm infants were the most affected by BSI, in which prematurity was associated with the presence of a maternal risk factor. In addition, CoNS was the most isolated bacterium in blood cultures and presented high resistance against oxacillin. Knowing the profile of the pathogens responsible for infections is an important tool to draw up plans and strategies that aim to guarantee the survival of hospitalized patients. In **Article II**, data from BSI in adult ICU are presented, is possible to verify the risk factors and the epidemiological and microbiological profiles. A survey of positive blood cultures in adult patients (>14 years) hospitalized in the ICU in the year 2016 was carried out. Patient information about the pathogenic bacteria responsible for BSI and its mechanism of

phenotypic resistance was collected from hospital admission. Of the 22 patients with positive blood cultures, 59.1% were aged ≥ 60 years, 54.5% were male, and 90.9% had a history of previous comorbidities, in which heart disease in patients with a diagnosis of BSI was considered a risk factor for an unfavorable clinical outcome ($p= 0.035$). CoNS was isolated in 54.2% of blood cultures and 76.9% were resistant to oxacillin. The BSI rate was low in the study population, but it was possible to know the epidemiological and microbiological profiles, helping to monitor infection control and patient safety. **Article III** presents the results of PCR standardizations in real time, using the *TaqMan* system for molecular discrimination of bacterial Gram. Specific Gram-PCR was performed, using universal primers and specific probes, in eight clinical isolates and three standard strains. The analytical sensitivity was determined by dilutions with an amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* DNA ranging from 1 ng/ μ L to 1 pg/ μ L. The analytical specificity of the probes was also tested using standard strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. With the *TaqMan* system, through the analytical specificity, it was possible to discriminate molecularly all the bacteria tested by Gram, with fluorescence emission in Gram-positive and Gram-negative isolates for their respective probes; for fungal isolates, there was no amplification. As to analytical sensitivity, the detection limit of *S. aureus* and *E. coli* was 10 pg/ μ L, where the efficiency was 93.055 ($R^2= 0.99$) and 69.592 ($R^2= 0.998$), respectively. Thus, it was possible to standardize specific *TaqMan* Gram-specific real-time PCR reactions, which obtained satisfactory efficiency in the analytical sensitivity and specificity assays. **Article IV** presents the results of PCR standardizations in real time, using the fluorophore Syber Green for the detection of genes involved in bacterial resistance. We tested primers in uniplex reactions for two Gram-positive bacterial resistance genes (*bla_{mecA}* e *bla_{vanA}*) and seven resistance genes in Gram-negative bacteria, in which four of them were tested in uniplex reaction (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{KPC}*) and three in multiplex reaction (*bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, and *bla_{NDM}*). The melting temperature (T_m) was: *bla_{mecA}* (75.7 °C), *bla_{vanA}* (85.3 °C), *bla_{CTX-M}* (88.9 °C), *bla_{SHV}* (91.2 °C), *bla_{TEM}* (85.5 °C), *bla_{IMP}* (81.3 °C), *bla_{SPM}* (84.1 °C), *bla_{VIM}* (87.3 °C), *bla_{KPC}* (89.8 °C) e *bla_{NDM}* (89.3 °C). Thus, it was possible to standardize reactions, uniplex and multiplex, to detect genes involved in antimicrobial resistance using the fluorophore Syber Green. These can be considered reproducible and important to help in choosing the appropriate antibiotic therapy.

Keyword: Molecular Diagnostic Techniques; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Gram-Positive Bacterial Infections; Gram-Negative Bacterial Infections; Genes, Bacterial; Genes, MDR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DO PROJETO

Figura 1: Sugestões de procedimentos para diagnóstico de bacteremia após positividade de método automatizado.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE QUADROS DO PROJETO

Quadro 1 – Alguns estudos de ICS a nível nacional e internacional.

Quadro 2 - Estudos utilizando PCR como técnica de diagnóstico de bacteremia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CO_2	Gás Carbônico
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESBL	β -lactamase de Espectro Estendido
$^{\circ}\text{C}$	Graus <i>Celcius</i>
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapanêmicos
MBL	Metalo- β -lactamase
MDR	Multidroga Resistente
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MRSCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa meticilina resistente
NDM	New Delhi Metalo- β -lactamases
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
pg	Picograma
qPCR	Reação da Cadeia de Polimerase quantitativo em tempo real
RS	Rio Grande do Sul
SCCmec	mec de cassette estafilocócica
SCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
UNISC	Universidade de Santa Cruz do Sul
UTI	Unidades de Terapia Intensiva

UTI-NEOPED	Unidades de Terapia Intensiva Neopediátrica
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina
XDR-ABC	Complexo <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> extensivamente resistentes aos antibióticos

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
$<$	Maior
\pm	Maior ou menor
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$>$	Menor
\geq	Menor ou igual
μ	Micro
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	17
<u>CAPÍTULO I</u>	
INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E MARCO TEÓRICO.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA E NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	21
3. OBJETIVOS.....	32
<u>CAPÍTULO II</u>	
ARTIGOS.....	33
ARTIGO I – INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEOPEDIÁTRICA: epidemiologia, microbiologia e fatores de risco obstétricos.....	34
ARTIGO II – INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: estudo retrospectivo em um hospital de ensino.....	37
ARTIGO III – <i>Real-time PCR standardization for bacterial cell wall discrimination</i>	40
ARTIGO IV – <i>DETECTION OF BACTERIAL RESISTANCE GENES: standardization of a molecular method</i>	42
<u>CAPÍTULO III</u>	
CONCLUSÕES GERAIS.....	45
<u>CAPÍTULO IV</u>	
NOTA À IMPRENSA.....	47
<u>CAPÍTULO V</u>	
RELATÓRIO DE CAMPO.....	49
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS	
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.....	66
ANEXO B – Ficha UTI adulto.....	71
ANEXO C – Ficha UTI neopediátrica.....	72
ANEXO D – Comprovante de submissão para a Revista Brasileira Saúde Materno Infantil	73
ANEXO E – Declaração de aceite e publicação da Revista Enfermagem Atual.....	74
ANEXO F – Gráficos com as amplificações resultantes das padronizações do Artigo III	75
ANEXO G – Gráficos com as amplificações resultantes das padronizações do Artigo IV.....	79

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está em conformidade com o Regimento do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul. A mesma encontra-se estruturada em seis partes: Introdução, objetivos e marco teórico; quatro artigos, em que dois são artigos científicos originais, um artigo original breve e uma comunicação breve; conclusões gerais; nota à imprensa com divulgação da importância desta pesquisa e seus principais achados; relatório do trabalho de campo; e anexos.

O artigo I apresentado nesta dissertação é intitulado “INFECCÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEOPEDIÁTRICA: epidemiologia, microbiologia e fatores de risco obstétricos”, o artigo II é intitulado “INFECCÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: estudo retrospectivo em um hospital de ensino”, o artigo III é intitulado “*Real-time PCR standardization for bacterial cell wall discrimination*” e o artigo IV é intitulado “*DETECTION OF BACTERIAL RESISTANCE GENES: standardization of a molecular method*”.

Cabe ressaltar que o artigo I já se encontra submetido para a Revista Brasileira Saúde Materno infantil (Qualis B1 interdisciplinar). O artigo II já foi aprovado para publicação na primeira edição, do ano de 2019, da Revista Enfermagem Atual (Qualis B2 interdisciplinar).

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E MARCO TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

Considerado um importante problema para a saúde pública, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são eventos indesejados que vêm ameaçando mundialmente a segurança dos pacientes internados em unidades hospitalares. São causas comuns de morbidade e mortalidade, estando relacionadas com o aumento do tempo de internação e com elevados gastos de procedimentos diagnósticos e medicamentosos (KAYE et al., 2014; NOUETCHOGNOU et al., 2016).

Devido ao uso indiscriminado da terapia antimicrobiana, o número de microrganismos resistentes frente aos antibióticos disponíveis no mercado farmacêutico está aumentando, gerando um grande desafio para as comissões de controle de infecção hospitalar (LAU et al., 2017; MORAES et al., 2013). Como reflexo das infecções por bactérias nosocomiais resistentes poderá ocorrer o prolongamento da internação hospitalar, com possíveis reinternações, aumento dos gastos hospitalares e morte (AGARWAL; SHIAU; LARSON, 2018; KAYE et al., 2014; KRAKER et al., 2011).

Dentre as IRAS que podem acometer os pacientes internados, as infecções da corrente sanguínea, também conhecidas como bacteremia, possuem grande importância epidemiológica devido aos notáveis riscos relacionados a morbimortalidade dos pacientes (DE LA ROSA; LEÓN; JAIMES, 2016; PHIL et al., 2016). As infecções de corrente sanguínea geralmente são decorrentes do uso de dispositivos médicos, como o cateter venoso central, as quais acontecem no local de inserção do cateter pelos microrganismos colonizantes da pele humana, ou pelo uso de soluções contaminadas infundidas no dispositivo (RODRIGUES et al., 2016; STOCCO et al., 2016; VERGARA; VÉLIZ; FICA, 2016).

Ao longo dos anos, a incidência das infecções da corrente sanguínea estão aumentando, principalmente quando associada ao uso de cateteres, provocadas por microrganismos Gram positivos, como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* sp. e outros cocos Gram positivos; e microrganismos Gram negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e outros bacilos Gram negativos (DE LA ROSA; LEÓN; JAIMES, 2016).

Para os pacientes com suspeita ou diagnóstico de infecção da corrente sanguínea, o início da terapia antimicrobiana é fundamental; quanto mais precoce o seu início, melhor será o prognóstico e as chances de sobrevivência do paciente (DIAMENT et al., 2011; POOLE; KIDD; SAEED, 2018). Normalmente, a presença de microrganismos viáveis no sangue do paciente é

determinada através da hemocultura, um exame crítico e de grande importância para avaliar uma terapia medicamentosa adequada (OPLUSTIL et al., 2010).

Apesar de ser considerada um padrão-ouro no diagnóstico de bacteremia, o resultado da hemocultura demora de 1 a 5 dias ou mais, dependendo do microrganismo causador da infecção. Para tentar amenizar o quadro clínico dos pacientes, medicamentos antimicrobianos são prescritos de maneira empírica, sem os dados de susceptibilidade, aumentando as chances para resultados terapêuticos inadequados, como a toxicidade e a resistência bacteriana (ECKER et al., 2010; OBENG-NKRUMAH et al., 2016; SITNIK et al., 2014).

Além disso, as técnicas convencionais de microbiologia para isolamento bacteriano normalmente não excedem 25% dos achados clínicos e laboratoriais indicativos de infecção bacteriana invasiva. Cabe ainda ressaltar que em 40% dos casos de população pediátrica com diagnóstico clínico de sepse, não é possível detectar os microrganismos patogênicos pelas técnicas microbiológicas convencionais (SANTOLAYA et al., 2011).

Diante disso, novos métodos que possibilitam identificar o agente patogênico e seu respectivo perfil de susceptibilidade antimicrobiana estão sendo desenvolvidos. Com o objetivo de reduzir o tempo de diagnóstico, a técnica de Reação da Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) possibilita detectar a bactéria patogênica e a sua resistência em amostras biológicas em um curto período de tempo, facilitando o início para um tratamento adequado (CHUNG et al., 2016; QUILES et al., 2015; ZBOROMYRSKA et al., 2016).

Em relação ao exposto, o objetivo deste estudo foi estudar a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea e desenvolver técnicas moleculares, utilizando métodos de qPCR, para auxiliar na rápida identificação bacteriana e dos genes envolvidos na resistência antimicrobiana.

2 INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA E NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

As infecções hospitalares, atualmente denominadas de IRAS, são definidas no Brasil conforme a Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998 como:

Aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. [...] quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convencionou-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão. São também convencionadas infecções hospitalares aquelas manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período. As infecções no recém-nascido são hospitalares, com exceção das transmitidas de forma transplacentária e aquelas associadas a bolsa rota superior a 24 (vinte e quatro) horas (BRASIL, 1998, Anexo II).

Por ser uma das principais complicações que pode vir acometer os pacientes hospitalizados, as IRAS são consideradas um grande problema de saúde pública devido as altas taxas de morbimortalidade e aos gastos relacionados a internação (BAMMIGATTI et al., 2017; NOUETCHOGNOU et al., 2016). Cabe lembrar que esses índices podem se agravar quando se trata de microrganismos que apresentam um perfil de resistência aos medicamentos antimicrobianos (KRAKER et al., 2011).

Em pacientes em estado crítico de saúde, as IRAS são importantes, pois podem estar influenciando diretamente em seu desfecho clínico. É notável que aqueles pacientes que estão internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) acabam se tornando propensos para adquirir estas infecções, devido ao seu grave quadro clínico e pela realização de intervenções médicas, cirúrgicas e uso de dispositivos invasivos como, por exemplo, cateter venoso central, ventilador mecânico e outros (RUTKOWSKA; PRZYBYLA; MISIOLEK, 2013; YUE et al., 2017).

Outra preocupação que envolve o ambiente hospitalar é a contaminação de superfícies inanimadas, a qual contribui para disseminação de patógenos através da contaminação cruzada. Esse fenômeno ocorre devido a transferência de bactérias, que são transmitidas pelas mãos dos profissionais de saúde ou pelo contato direto do paciente com material ou ambiente contaminado. Dentre as superfícies inanimadas que podem ocasionar contaminação cruzada, citam-se os equipamentos médicos (estetoscópio, equipamento de ultrassom) e os locais de alto contato (telefones, teclado, prontuários) (BRIXNER; RENNER; KRUMMENAUER, 2016; GALVIN et al., 2012; RUSSOTTO et al., 2015).

Ressalta-se, então, a importância da higienização das mãos nestas unidades de internação, que é considerada a estratégia mais eficaz para prevenção de infecções nosocomiais. É necessário validar uma metodologia adequada e treinar a equipe de saúde, bem como os visitantes e/ou cuidadores para higienização das mãos e, desta maneira, visa diminuir o risco de contaminação cruzada através da propagação de microrganismos nestes ambientes de cuidados críticos (FOÀ et al., 2017; NEO, 2017).

2.2 Sangue e infecções da corrente sanguínea

O sangue é um dos locais do organismo considerado estéril (OLUYEGE et al., 2015) e quando há presença de bactérias e/ou fungos viáveis circulantes é sugestivo que o indivíduo esteja com uma infecção da corrente sanguínea. A entrada de microrganismos viáveis na corrente sanguínea ocorre de duas maneiras distintas, sendo classificadas como: infecção da corrente sanguínea primária, quando ocorre a entrada do microrganismo no sangue de uma maneira direta, seja via agulha, através de infusões ou equipamentos vasculares contaminados; e, infecção da corrente sanguínea secundária, quando a bactéria ou fungo, causador de uma infecção primária, são drenados através dos vasos linfáticos para o sangue (OPLUSTIL et al., 2010).

Para a obtenção de um tratamento antimicrobiano adequado, leva-se em consideração a presença ou não de hemocultura positiva, sinais e sintomas da infecção, quando o paciente apresenta alguma outra infecção de foco primário e quando está utilizando algum tipo de dispositivo médico invasivo. Deve-se levar em consideração o resultado da hemocultura negativo, quando o paciente apresentar sintomas clínicos de infecção da corrente sanguínea; isto pode ocorrer com o uso prévio de antibioticoterapia, dificultando o crescimento e identificação do microrganismo causador do processo infeccioso. Em pacientes pediátricos (menores de 1 ano), os critérios clínicos são a febre ($>38^{\circ}\text{C}$), a hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$) ou a bradicardia/taquicardia, ambos não relacionados com infecção de sítio primário; nos demais, considera-se a febre ($>38^{\circ}$), os tremores, a oligúria e a hipotensão, ambos não relacionadas com outra infecção (MANGINI et al., 2013).

2.3 Epidemiologia

Dentre as diversas patologias infecciosas que podem vir a acometer um paciente internado, a bacteremia é uma das mais relevantes, sendo responsável por causar desfechos clínicos desfavoráveis, como a sepse (DAL-BÓ; SILVA; RUTKOWSKA; PRZYBYŁA; MISIOŁEK, 2013; SAKAE, 2012; SCERBO et al., 2016). Em UTI, devido ao estado crítico

dos pacientes e a necessidade de utilizar dispositivos médicos invasivos, as taxas de infecção de corrente sanguínea podem alcançar taxas de até 90%, quando relacionado ao uso do cateter venoso central (CVC) (SALAMA et al., 2016). Um estudo realizado na Tailândia encontrou uma densidade de incidência de 7,5/1000 infecção de corrente sanguínea/CVC/dia (SRISAN; JUHONG; KANJANAPATANAKUL, 2014).

Nos últimos anos, diversos estudos discutiram sobre as infecções de corrente sanguínea, tanto a nível mundial como no Brasil, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Alguns estudos de ICS a nível nacional e internacional.

ESTUDOS NO BRASIL				
Autor (ano)	Estado	Amostra	Bactérias causadoras da ICS	Principais achados
Sousa et al. (2015)	Piauí	68 pacientes idosos internados em clínica cirúrgica.	<i>Acinetobacter</i> spp.; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; SCoN; <i>Escherichia coli</i> .	A idade avançada está associada com um risco aumentado para desenvolver ICS.
Freire et al. (2016)	São Paulo	Pacientes oncológicos internados na UTI e com diagnóstico de ICS por XDR-ABC.	<i>Acinetobacter baumannii</i> .	ICS por XDR-ABC possui alta mortalidade relacionada a pacientes oncológicos, apresentando taxa de mortalidade de 30 dias de 83,7%.
Fram et al. (2015)	São Paulo	162 pacientes (81 casos e 81 controles) em unidade satélite de hemodiálise.	<i>Staphylococcus aureus</i> ; SCoN; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Staphylococcus haemolyticus</i> ; <i>Staphylococcus lugdunensis</i> ; <i>Enterobacter</i> spp; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .	Microorganismos Gram positivos foram os mais frequentemente isolados (72,8%); <i>S. aureus</i> (32,1%), com 38,5% resistentes à oxacilina. Reforça, ainda, que devem ser adotadas medidas preventivas para as ICS relacionada ao uso de cateter venoso central devem ser fortalecidas e aplicadas de maneira efetiva e correta em unidades de tratamento de hemodiálise.
Fortaleza et al. (2014)	São Paulo	1.468 pacientes internados em hospital e que desenvolveram ICS (2005-2010).	<i>Staphylococcus aureus</i> ; SCoN; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella</i> spp.; <i>Enterobacter</i> spp; <i>Escherichia coli</i> .	67% casos de ICS foi por BGN. A sazonalidade influencia na ICS; em meses quentes se teve aumento de ICS por <i>Enterobacter</i> spp. e <i>A. baumannii</i> .

ESTUDOS EM OUTRO PAÍSES				
Autor (ano)	País	Amostra	Bactérias causadoras da ICS	Principais achados
Testoni et al. (2014)	Estados Unidos	Bebês nascidos \geq 37 semanas de gestação e admitidos na UTI em até 120 dias de vida.	<i>Escherichia coli</i> ; SCoN; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Enterococcus</i> sp.; <i>Klebsiella</i> sp.; <i>Enterobacter</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Serratia</i> sp.	A incidência de ICS de início tardio (4-120 dias de vida) foi de 2,7/1000 admissões. Resultado importante para ICS tardia em lactentes sem anomalias congênitas. Fator de risco independente para o óbito.
Lim et al. (2014)	Coréia	129 Pacientes internados em UTI e com diagnóstico de ICS.	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Acinetobacter</i> spp.; SCoN; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	A incidência foi de 5,3/1000 ICS/dia. Há associação de ICS com a mortalidade nos pacientes em estado crítico admitidos na UTI e, um controle de infecção adequado pode reduzir essa incidência.
Prowle et al. (2011)	Austrália	330 pacientes internados na UTI e com diagnóstico de ICS.	BGN, <i>Staphylococcus aureus</i> ; SCoN; <i>Enterococcus</i> spp.	ICS adquirida na UTI está associada a maior mortalidade, porém complica apenas 5% destas internações.
G/Eyesus et al. (2017)	Etiópia	251 neonatos internados no hospital.	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; SCoN; <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Alta taxa de patógenos bacterianos isolados na sepse. 70% dos isolados eram MDR.
Venturini et al. (2016)	Itália	Pacientes menores de 18 anos internados no hospital.	Bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Staphylococcus aureus</i> ; SCoN.	Das ICS identificadas, 5 eram ESBL e 1 KPC, confirmando a disseminação de bactérias multirresistente nas infecções em crianças.

Legenda: ICS (Infecção da Corrente Sanguínea); UTI (Unidade de Terapia Intensiva); XDR-ABC (Complexo *Acinetobacter baumannii* e *Acinetobacter calcoaceticus* extensivamente resistentes aos antibióticos); SCoN (*Staphylococcus coagulase negativa*); BGN (Bacilos Gram negativo); MDR (Multidroga resistente); ESBL (β -lactamase de espectro estendido); KPC (*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos).

Algumas patologias estão associadas a um risco elevado para o desenvolvimento da infecção de corrente sanguínea, como por exemplo, os pacientes em hemodiálise e os com diagnóstico de câncer. Na hemodiálise, o que aumenta o fator de risco para o surgimento de bacteremia é o uso de CVC (SUZUKI et al., 2016). Um estudo realizado nos Estados Unidos, indicou que o crescimento bacteriano em hemoculturas de pacientes em uso de CVC apresentou uma taxa de 1,86/1000 infecção/dia, situação que pode ser reduzida ao se utilizar outros métodos, como a fístula arteriovenosa (0,08/1000 infecção/dia) e enxerto arteriovenoso (0,31/1000 infecção/dia) (ZHANG et al., 2016). Quando comparado pacientes em diálise com

a população em geral, é notável o aumento da incidência dos casos de bacteremia sendo, respectivamente, de 13,7/100 indivíduo/ano e 0,53/100 indivíduo/ano (SKOV et al., 2015).

Em pacientes oncológicos, a bacteremia é considerada uma grande complicação, sendo a patologia mais comumente associada com a septicemia, podendo ser evidenciada em quase 17% dos casos (MARTIN et al., 2003). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a taxa de incidência de sepse estimada foi de 160/1000 casos de pacientes oncológicos/ano (WILLIAMS et al., 2004), sendo que em pacientes hematológicos a incidência de bacteremia é maior do que quando confrontado aos com tumores sólidos (GUDIOL; AGUADO; CARRATALÀ, 2016). Em estudo realizado no Reino Unido, a incidência geral de infecção de corrente sanguínea foi de 5,5/1000 internações de paciente com câncer, sendo que para os com neoplasia hematológica estimou-se uma incidência de 10,9/1000 internação e para os com tumores sólidos, 3,6/1000 internações (SCHELENZ; NWAKA; HUNTER, 2013).

Outra população vulnerável são os pacientes neonatais, principalmente os prematuros internados em UTI, cujas chances de desenvolver infecção da corrente sanguínea aumentam devido aos inúmeros procedimentos invasivos realizados (G/EYESUS et al., 2017; GRAHAM; 2010; TESTONI et al., 2014). O uso de CVC está associado a complicações no quadro clínico dos neonatais, em que a infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateteres são as mais comuns (DUESING; FAWLEY; WAGNER, 2016; GARCÍA et al., 2019; GRAHAM; 2010). Em um estudo realizado em UTI neonatal na Cidade do México, a taxa de incidência de infecção da corrente sanguínea relacionada ao uso de CVC foi de 14,1/1000 dias de cateter (GARCÍA; MARTÍNEZ; PEREGRINO, 2014). Já em outro estudo, realizado em todos os hospitais estaduais da Grécia, encontrou uma taxa de incidência de infecção da corrente sanguínea relacionada ao uso de linha central de 6,02/1000 dias de uso de CVC nas UTIs neonatais (KOUNI et al., 2019).

2.4 Microrganismos Gram positivos e resistência

2.4.1 *Staphylococcus* sp.

São bactérias cujas características morfológicas se apresentam em formato de cocos Gram positivos esféricos. O *Staphylococcus aureus* é a espécie que possui prova positiva para coagulase e suas infecções podem ser classificadas como superficiais (aquelas que causam danos na pele e no tecido celular subcutâneo, sendo normalmente ocasionadas devido a invasão direta dos tecidos por esta bactéria que coloniza a pele e mucosas) e profundas (decorrente de bacteremias que se originaram de outra infecção superficial ou, de maneira eventual, de uma

pneumonia por aspiração). Apesar do *S. aureus* ser um dos patógenos mais relacionados a bacteremia, devido a sua associação ao uso de cateter intravenoso, outro microrganismo deste gênero, o *Staphylococcus epidermidis*, também está relacionado com o uso desse dispositivo invasivo e infecção da corrente sanguínea (LEVINSON, 2010a; TEIXEIRA et al., 2008;).

Em relação ao mecanismo de resistência bacteriana, sabe-se que as cepas de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), são intercedidas principalmente pelo o gene *mecA*, veiculado a um elemento genético móvel, conhecido como cromossomo *mec* de cassette estafilocócica (SCC*mec*); em pacientes internados e que apresentam fatores de risco, geralmente se encontra os tipos SCC*mec* I, II e III, os quais são considerados multirresistentes frente a terapia antimicrobiana (DEURENBERG et al., 2007; OTTER; FRENCH, 2010).

O gene *mecA* codifica a proteína resistente à meticilina, produzindo uma proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a), diferente das outras proteínas de ligação com a penicilina que não sofreram mudança de conformação, dificultando a ligação da meticilina no sítio ativo. Assim, a PBP2a inativa a ação antimicrobiana da meticilina e de outros antibióticos β -lactâmicos (HAVAIEI et al., 2015; KIM et al., 2013; XIA et al., 2013).

2.4.2 *Enterococcus* sp.

São cocos Gram positivos e, dentro deste gênero, destaca-se o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium* devido aos casos relacionados deste patógeno com as IRAS (HAMMERUM et al., 2017). São bactérias encontradas na flora intestinal de indivíduos saudáveis e, as infecções ocorrem devido a migração desta bactéria para os órgãos ou locais sensíveis; desta maneira, está muito relacionado com infecções do trato urinário, de feridas e da corrente sanguínea (O'DRISCOLL; CRANK, 2015; TEIXEIRA; MERQUIOR; TRABULSI, 2008).

No ambiente hospitalar é considerado um patógeno importante, devido a sua resistência progressiva aos antimicrobianos, principalmente os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). Além disso, os *Enterococcus* spp. possuem a capacidade de transferir essa resistência para outros gêneros e espécies bacterianas como, por exemplo, para o *S. aureus* (SHOKOUHI et al., 2017). A resistência à vancomicina pode ser codificada por diversos *clusters*, como o *vanA* e *vanB*, encontrados nos plasmídeos conjugativos e o *vanC*, encontrado no cromossomo. A presença do gene *vanA* manifesta a resistência da bactéria para vancomicina e teicoplanina, diferentemente do gene *vanB*, o qual demonstra resistência para a vancomicina e sensibilidade para a teicoplanina (IWERIEBOR; OBI; OKOH, 2015).

2.5 Microrganismos Gram negativos e resistência

2.5.1 Enterobacteriaceae

Uma das mais importantes famílias bacterianas de importância médica, cujos gêneros são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores de glicose, muito deles são frequentemente encontrados no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (MARTINEZ; TRABULSI, 2008).

Dentro dessa família encontram-se as espécies de *Escherichia* spp. (infecção do trato urinário, diarreia e meningite neonatal), *Shigella* spp. (disenteria), *Salmonella* spp. (febre tifoide, enterocolite e septicemia), *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Klebsiella* spp. (ambas causando pneumonia, infecção urinária e bacteremia), *Proteus* spp., *Providencia* spp., e *Morganella* spp. (ambos originando principalmente infecção urinária) (LEVINSON, 2010b).

Referente aos mecanismos de resistência que estas bactérias podem desenvolver frente a antibióticos β -lactâmicos, citam-se as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL), através dos genes *bla*_{BES-1}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}; AMPc mediada por plasmídeos (FOX-5 e CMY-2), produtoras de carbapanemase (*bla*_{IMP}, *bla*_{CTM-X}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} e *bla*_{NDM}) e Metalo- β -lactamases (MBL), através dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} (IOVLEVA; DOI, 2017; KOMATSU et al., 2018; SAMPAIO; GALES, 2016). Além disso, já se tem descrito mecanismo de resistência codificados por cromossomos, seja em decorrência das alterações enzimáticas da topoisomerase (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*), alteração na permeabilidade da membrana, modificando a expressão das proteínas/Porina (OmpF e OmpC) e por bomba de efluxo (AcrA, AcrB e TolC) (YANAT; MARTÍNEZ; TOUATI, 2017).

2.5.2 *Pseudomonas* sp.

Este gênero bacteriano é classificado como bacilos Gram negativos e é encontrado nos ambientes (JEUKENS et al., 2017). A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria encontrada no solo e muito relacionada com infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos e em estado crítico de saúde, como as infecções pulmonares agudas (ALBUQUERQUE et al., 2016; VENTO; CAINELLI; TEMESGEN, 2008) e bacteremias (TOFAS et al., 2017) em pacientes oncológicos, infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística (MOORE; MASTORIDIS, 2017), além de infecções em feridas de pacientes queimados (EVERETT et al., 2017) e em pé diabético (PARSA; SAMANI, 2015).

Devido a sua notória habilidade em desenvolver genes de resistência, a *P. aeruginosa* é considerada um grande problema quando associada a IRAS, podendo adquirir mecanismos de

resistência intrínsecos e extrínsecos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; LIVERMORE, 2002). Das resistências intrínsecas, cita-se a superexpressão da bomba de efluxo (*mexAB*, *mexCD*, *mexEF* e *mexXY*) e através de enzima codificada cromossomicamente (AMPc); a extrínseca ocorre através da obtenção plasmidial de genes de resistência, como as ESBL, através dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{VEB}*, *bla_{PER}*, *bla_{OXA}* e *bla_{CTX-M}* e as carbapenemases, através dos genes *bla_{GES}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{NDM}* (BOKAEIAN et al., 2015; DREIER; RUGGERONE, 2015; POOLE, 2011; RIZEK et al., 2014).

2.5.3 *Acinetobacter* sp.

Gênero bacteriano cujas características morfológicas são cocobacilos Gram negativos, aeróbicos e imóveis (LIN; LAN, 2014). O *Acinetobacter baumannii* é a espécie mais importante deste gênero, devido as graves IRAS que este patógeno pode ocasionar, tais como: bacteremia (BALLOUZ et al., 2017; FREIRE et al., 2016), pneumonia associada a ventilação mecânica (GALAL; YOUSSEF; IBRAHIEM, 2016; ÖZGÜR et al., 2014), infecção de pele e tecidos moles (LOB et al., 2016), feridas decorrente de queimadura (ASATI; CHAUDHARY, 2017; GAO et al., 2014), infecção urinária e meningites (DOI; MURRAY; PELEG, 2015).

É preocupante o acúmulo de diferentes mecanismos de resistência que o *A. baumannii* pode adquirir. Atualmente, não há muitas opções de antibioticoterapia disponíveis para tratar infecções ocasionada pela bactéria multirresistente, pois ocorre uma redução gradual na ação dos antibióticos (LEE et al., 2017). Os mecanismos de resistência descritos para este gênero são: (1) inativação enzimática ou modificação de antimicrobianos (AMPc; Oxacilinas sem carbapenemase (*bla_{OXA}*); MBL, através dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}* e *bla_{NDM}*; Carbapenemases não MBL, através dos genes *bla_{OXA}* e *bla_{KPC}* e ESBL, através dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* e *bla_{CTX-M}*); (2) Modificação do sítio de ação dos antimicrobianos (mutações *gyrA* e *parC*; alteração do local de ligação ribossomal (*RmtB*, *ArmA*); alteração do lípido A do lipopolissacarídeo bacteriano e perda de lipopolissacarídeo (*lpxA* mutado, *lpxC*, *lpxD*)); (3) alteração na permeabilidade de membrana, através da perda de proteína de membrana externa/Porina e (4) Bombas de efluxo (*AdeABC*, *AdeFGH*, *AdeIJK*, *AbzM*) (DOI; MURRAY; PELEG, 2015; LYNCH; ZHANEL; CLARK, 2017; POTON; POIREL; NORDMANN, 2015).

2.6 Hemocultura versus reação em cadeia da polimerase em tempo real

Atualmente, o exame laboratorial considerado padrão-ouro para detectar a presença de bactérias viáveis no sangue é a hemocultura. A cultura de sangue possui baixa sensibilidade e,

além disso, a técnica de diagnóstico é lenta, pois os frascos de hemocultura necessitam um longo período de incubação, podendo variar de 24 a 72 h para resultados positivos e, até 5 dias para resultados negativos (ECKER et al., 2010; MARCO et al., 2016; MAURO et al., 2012; SITNIK et al., 2014).

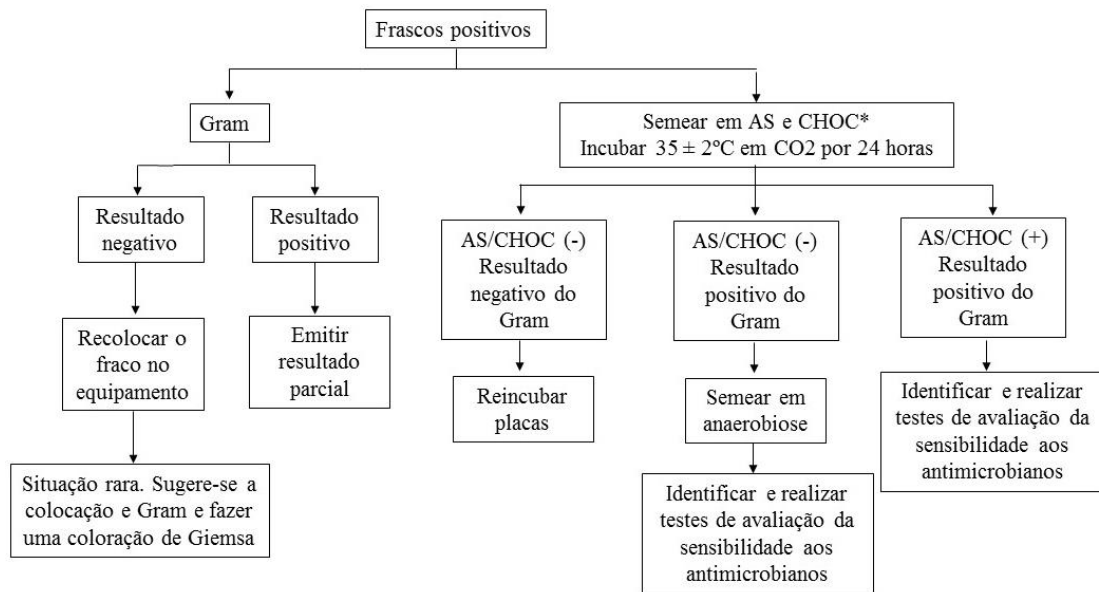
Para melhor a sensibilidade deste método, devem ser seguidas algumas recomendações que melhoram as chances de isolamento bacteriano, tais como: coletar um volume de sangue apropriado (20 mL em adultos, 1 a 5 mL em crianças e 0,5 a 1 mL em recém-nascidos); coletar o sangue durante a elevação da temperatura corporal do paciente; coletar o sangue antes de iniciar a terapia antimicrobiana; de preferência, coletar duas amostras de sangue em locais diferentes (uma hemocultura para cada amostra) e evitar coletar amostras em cateteres (DELLINGER et al., 2013; OPLUSTIL et al., 2010). Esses cuidados devem ser realizados para evitar que a carga de microrganismos no sangue seja baixa e intermitente, devendo considerar ainda o volume sanguíneo, o número de culturas, os meios de culturas, o método de detecção e o tempo de incubação como fatores que comprometem os resultados das hemoculturas (JACOBS et al., 2017).

Visando melhorar/agilizar o resultado de diagnóstico através de frascos para hemocultura convencional, surgiram metodologias automatizadas que podem positivar nas primeiras 24 horas de incubação, minimizando o tempo para início de antibioticoterapia. A técnica consiste na detecção automática da produção de CO₂ originado pelo metabolismo de crescimento microbiano no meio de cultivo. Após essa positividade, é necessário a realização de outros procedimentos manuais para a identificação e perfil de sensibilidade bacteriana (Figura 1) (LIN et al., 2013; OPLUSTIL et al., 2010; SURASE et al., 2016).

Em pacientes pediátricos é fundamental o rápido diagnóstico de infecção da corrente sanguínea e, a metodologia automatizada atende este requisito, sendo também mais sensível quando comparado com a metodologia convencional. Além da identificação precoce dos microrganismos, auxilia na redução da internação hospitalar e o paciente recebe a terapia antimicrobiana adequada (AHAMAD et al., 2017).

Atualmente, os exames moleculares são considerados ferramentas importantes para o rápido diagnóstico de de infecção da corrente sanguínea (POOLE; KIDD; SAEED, 2018). Dentre esses, a técnica da PCR é bastante promissora, a qual consiste na amplificação das sequências do DNA bacteriano quando presente em amostra sanguínea de pacientes, de maneira rápida e altamente sensível (GUPTA et al., 2016; PUNIA et al., 2017). Diversos estudos (Quadro 2) já descrevem as vantagens desta metodologia molecular.

Figura 1: Sugestões de procedimentos para diagnóstico de bacteremia após positividade de método automatizado.



*Na presença de bacilos Gram negativos, semear também em ágar MacConkey. Legenda: AS (ágar sangue); CHOC (ágar chocolate). Adaptado de OPLUSTIL et al., 2010.

Quadro 2 - Estudos utilizando PCR como técnica de diagnóstico de bacteremia.

Autor (ano)	País do estudo	Período do estudo	Paciente/unidade	Tipo de diagnóstico	Principais achados
Chan et al. (2009)	Japão	03/2006 – 06/2008	Neonatal/UTI	QPCR	Sensibilidade e especificidade para bactéria Gram negativas (86,4 e 99,0%, respectivamente) e Gram positivas (73,7 e 98,5%, respectivamente). A QPCR se mostrou um ensaio confiável, específico e rápido para identificação de bactérias no sangue.
Dark et al. (2011)	Reino Unido	-	Adulto/UTI	<i>SeptiFast multiplex</i> QPCR	Quando comparada a hemocultura, a técnica de PCR é melhor, devido ao curto tempo para a realização da técnica e a especificidade e sensibilidade do método.
Wang et al. (2014)	República da Coreia	12/2011-01/2013	-	<i>TaqMan</i> QPCR	A sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 99,6% e 89,5%. A QPCR é mais eficaz para o rápido rastreio de ICS do que o diagnóstico microbiológico convencional.
McCann et al. (2015)	Estados Unidos	03/2009-06/2012	Adulto/UTI	QPCR e pirosequenciamento	Em comparação com a cultura de sangue, a PCR/ pirosequenciamento obteve valores de 90,9% de sensibilidade e 99,6% especificidade. Identificação de bactérias no sangue mais rápida que os exames fenotípicos disponíveis e escolha de tratamento antimicrobiano adequado.
Dinç et al. (2016)	Turquia	03/2012-11/2012	Adulto/UTI	<i>LightCycler SeptiFast multiplex</i> QPCR	A sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 80% e 69%. Apesar destes resultados serem considerados moderados, o <i>LightCycler SeptiFast</i> QPCR pode ser útil quando adicionado à hemocultura no diagnóstico de sepse.
Carlesse et al. (2016)	Brasil	03/2011-03/2012	Pediatria	<i>TaqMan e Sybr Green</i> QPCR	As técnicas de QPCR identificam rapidamente os microrganismos patogênicos e seus respectivos genes de resistência antimicrobiana.
Marco et al. (2016)	Itália	09/2012-06/2013	Pediatria	<i>Magicplex Sepsis</i> em tempo real	O <i>Magicplex</i> permitiu um aumento de 143% no diagnóstico das hemoculturas. A hemocultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de ICS, mas o <i>Magicplex</i> pode ser um importante teste adjuntivo para identificação rápida de patógenos em crianças, especialmente quando imunocomprometidas.
Korber et al. (2017)	Áustria	2007-2010	-	<i>SeptiFast</i> QPCR	<i>SeptiFast</i> QPCR permitiu uma rápida detecção de patógenos clinicamente importantes que não foi possível ser identificados na hemocultura.
Liu et al. (2018)	China	2013-2015	-	<i>TaqMan</i> QPCR	A <i>TaqMan</i> QPCR possui alta sensibilidade e especificidade. É um método rápido e preciso para detectar os patógenos, sendo promissor no diagnóstico de sepse.

Legenda: UTI (Unidade de Terapia Intensiva); ICS (Infecção da Corrente Sanguínea)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea e desenvolver métodos moleculares de diagnóstico de infecções bacterianas e de genes envolvidos na resistência antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento epidemiológico das infecções de corrente sanguínea notificadas no ano de 2016 nas UTIs adulto e neopediátrica do hospital em estudo;
- Padronizar técnicas baseadas em biologia molecular para a identificação de bactérias Gram negativas e Gram positivas em cepas padrão e isolados clínicos;
- Padronizar técnicas de identificação de genes de resistência antimicrobiana em bactérias Gram negativas (β -lactamase de espectro estendido (ESBL), metalo- β -lactamase (MBL) e KPC) e Gram positivas (*mecA*, *vanA*).

CAPÍTULO II
ARTIGOS

ARTIGO I

INFECCÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEOPEDIÁTRICA: epidemiologia, microbiologia e fatores de risco obstétricos

Elaborado conforme as normas na Revista Brasileira Saúde Materno Infantil

Qualis Capes: B1

Área: Interdisciplinar

**INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA
INTENSIVA NEOPEDIÁTRICA: epidemiologia, microbiologia e fatores de risco
obstétricos**

*BLOODSTREAM INFECTION IN A NEOPEDIATRIC INTENSIVE CARE UNIT:
epidemiology, microbiology and obstetric risk factors*

Betina Brixner¹, Nayanna Dias Bierhals¹, Caio Fernando de Oliveira¹, Jane Dagmar Pollo Renner¹

¹Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

RESUMO

Objetivo: avaliar a frequência das infecções de corrente sanguínea (ICS) de pacientes neopediátricos e relacioná-las com o perfil epidemiológico, microbiológico e complicações obstétricas em uma unidade de terapia intensiva neopediátrica (UTI-NEOPED), na região sul do Brasil.

Métodos: Estudo transversal e retrospectivo, realizado através do levantamento de dados das hemoculturas com crescimento bacteriano em pacientes internados na UTI-NEOPED, no ano de 2016, utilizando o sistema informatizado (MV2000[®]) do hospital. Foram coletadas informações dos pacientes e sua internação, microrganismos e seu perfil de susceptibilidade antimicrobiano e dados maternos e gestacionais.

Resultados: Dos 33 pacientes acometidos pela ICS, 66,7% eram meninas, 81,8% estavam na faixa etária de 0-28 dias e 36,4% pesaram entre 1.501-2.500 gramas ao nascer. As mães possuíam em média de $27 \pm 7,3$ anos e 87,9% apresentavam alguma complicação obstétrica. 72,7% dos pacientes nasceram com menos de 34 semanas gestacionais. Nas hemoculturas foram isoladas 9 espécies bacterianas, em que 53,5% eram *Staphylococcus* coagulase negativa e 82,6% eram resistentes à oxacilina.

Conclusões: O sexo feminino e recém-nascidos prematuros foram os mais acometidos pela ICS. A prematuridade foi associada com a presença de fator de risco obstétrico. A bactéria mais isolada nas hemoculturas foi o *Staphylococcus* coagulase negativa com alta resistência à oxacilina.

Palavras-chave: Unidade de Terapia Intensiva; Pediatria; Fatores de Risco; Bacteremia

ABSTRACT

Objective: to evaluate the frequency of bloodstream infections (BSI) in neopediatric patients and to relate them to the epidemiological, microbiological profile and obstetric complications in a neopediatric intensive care unit (ICU-NEOPED) in southern Brazil.

Methods: A cross-sectional and retrospective study carried out through the collection data from blood cultures with bacterial growth in patients hospitalized at the ICU-NEOPED in 2016, using the computerized system (MV2000®) of the hospital. Information about the patients and their hospitalization, microorganisms and their antimicrobial susceptibility profile and maternal and gestational data were collected.

Results: Of the 33 patients affected by BSI, 66.7% were girls, 81.8% were in the age group 0-28 days, and 36.4% weighed between 3.309-5.512 pounds at birth. Mothers had a mean age of 27 ± 7.3 years and 87.9% had some obstetric complication. 72.7% of the patients were born with less than 34 gestational weeks. 9 bacterial species were isolated in blood cultures, in which 53.5% were Coagulase negative *Staphylococcus* and 82.6% were oxacillin-resistant.

Conclusions: Females and preterm infants were the most affected by BSI. There was an association of prematurity with the presence of obstetric risk factor. Coagulase negative *Staphylococcus* was the most isolated bacteria in blood cultures and presented high oxacillin resistance.

Key words: Intensive Care Units, Pediatrics, Risk Factors, Bacteremia.

ARTIGO II

INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: estudo retrospectivo em um hospital de ensino

Elaborado conforme as normas na Revista Enfermagem Atual

Aprovado para publicação na primeira edição de 2019

Qualis Capes: B2

Área: Interdisciplinar

**INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA:
estudo retrospectivo em um hospital de ensino**

*BLOODSTREAM INFECTIONS IN INTENSIVE CARE UNIT: retrospective study in a teaching
hospital*

Betina Brixner¹, Nayanna Dias Bierhals¹, Caio Fernando de Oliveira¹, Jane Dagmar Pollo Renner¹

¹Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os fatores de risco e perfil epidemiológico dos pacientes diagnosticados com infecção de corrente sanguínea, bem como os microrganismos responsáveis pela infecção. Estudo transversal, em que foi realizado um levantamento das hemoculturas e dados dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva adulto com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea, durante o ano de 2016. Foram coletadas informações referentes ao paciente e sua internação, bem como ao agente responsável pela infecção e seu mecanismo de resistência fenotípico. Foram incluídas 24 hemoculturas positivas para crescimento bacteriano. A média de idade dos pacientes foi de 53,9±21,1 anos e 54,5% dos pacientes acometidos pela infecção eram homens. Dos pacientes, 59,1% apresentavam histórico de doença cardíaca, sendo que destes, 63,6% foram a óbito. As bactérias Gram positivas foram mais relacionadas com a infecção, em que 54,2% eram *Staphylococcus* coagulase negativa e destes, 76,9% foram resistentes metilina. Identificou-se que o sexo masculino, indivíduos idosos e com histórico de alguma comorbidades prévia, com destaque para as doenças cardíacas, foram os mais acometidos com bacteremia. Quanto ao agente bacteriano responsável pela infecção, o *Staphylococcus* coagulase negativa foi o mais relacionado aos casos diagnosticados, bem como o seu alto perfil de resistência deste microrganismo frente a metilina.

Palavras-chave: Bacteremia; Fatores de Risco; Diagnóstico; Unidade de Terapia Intensiva.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the risk factors and epidemiological profile of the patients diagnosed with bloodstream infection, as well as the microorganisms responsible for the infection. A cross-sectional study was carried out in which blood cultures were collected and data were collected from patients admitted to an adult intensive care unit with a diagnosis of bloodstream infection during

the year 2016. Information about the patient and hospitalization was collected, as well as the agent responsible for the infection and its mechanism of phenotypic resistance. 24 blood cultures positive for bacterial growth were included. The mean age of the patients was 53.9 ± 21.1 years and 54.5% of the patients affected by the infection were men. Of the patients, 59.1% had a history of heart disease, of which 63.6% died. Gram positive bacteria were more related to infection, in which 54.2% were coagulase negative *Staphylococcus* and of these, 76.9% were resistant to methicillin. It was identified that the male sex, elderly individuals and with history of some previous comorbidities, especially heart diseases, were the most affected with bacteremia. As for the bacterial agent responsible for the infection, Coagulase negative *Staphylococcus* was the most related to the diagnosed cases, as well as its high resistance profile of this microorganism against methicillin.

Keywords: Bacteremia; Risk factors; Diagnosis; Intensive Care Unit.

ARTIGO III

**REAL-TIME PCR STANDARDIZATION FOR BACTERIAL CELL
WALL DISCRIMINATION**

Elaborado conforme as normas na revista *The Journal of Infection in Developing Countries*.

Qualis Capes: B1

Área: Interdisciplinar

Real-time PCR standardization for bacterial cell wall discrimination

Betina Brixner¹, Nayanna Dias Bierhals¹, Carolina Marques Corrêa¹, Karoline Schroder da Silva¹, Caio Fernando de Oliveira^{1,2}, Jane Dagmar Pollo Renner¹

¹Laboratory of Biotechnology and Oleoquímica of the Regional Scientific and Technological Park (TecnoUnisc), Laboratory of Teaching in Microbiology and Biotechnology, University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, Brazil.

²Laboratório Santa Cruz Laboratory, Santa Cruz do Sul, Brazil.

Corresponding author

Jane Dagmar Pollo Renner, Dra.

Assistant Coordinator of Health Promotion Postgraduate Program

Av. Independência, 2293 - Universitário, Santa Cruz do Sul - RS, 96815-900, Bloco 42, sala 4206

Tel: 55 (51) 37177603

Fax: 55 (51) 37177300

E-mail: janerenner@unisc.br

Introduction: Molecular methods are being widely implemented and are considered very promising in the early diagnosis of critical patients with infectious processes. These methods are recognized for speed, reliability, sensitivity and specificity. The aim of this study was to standardize a real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) for discrimination of bacterial cell wall.

Methodology: An experimental study in which the bacterial deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted by the alkaline lysis washing method. Determination of the analytical specificity of the bacterial cell wall discrimination was performed by real-time PCR using the *TaqMan* system. Universal primers and specific probes were used in clinical isolates and standard strains, including 4 Gram-positive pathogens, 7 Gram-negative pathogens, and 2 pathogenic fungi. The analytical sensitivity was determined by 1:10 dilutions (1 ng/μl to 1 pg/μl) with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* DNA.

Results: With this *TaqMan* system it was possible to classify the bacterial cell wall according to its Gram stain. The DNA detection limit for *S. aureus* and *E. coli* was 10 pg / μl, where the efficiency was 93.055 ($R^2 = 0.99$) and 69.592 ($R^2 = 0.998$), respectively.

Conclusions: We standardize a Real-time PCR with the *TaqMan* system able to discriminate bacteria according to its Gram stain.

Running title

qPCR standardization for bacterial sample

Key words

Molecular Diagnostic Techniques; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Gram-Positive Bacterial Infections; Gram-Negative Bacterial Infectio

ARTIGO IV

**DETECTION OF BACTERIAL RESISTANCE GENES: standardization
of a molecular method**

Elaborado conforme as normas na revista *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

Qualis Capes: B1

Área: Interdisciplinar

DETECTION OF BACTERIAL RESISTANCE GENES: standardization of a molecular method

Betina Brixner^a, Nayanna Dias Bierhals^a, Karoline Schroder da Silva^a, Caio Fernando de Oliveira^{a,b}, Jane Dagmar Pollo Renner^{a,*}

^a University of Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

^b Santa Cruz Laboratory, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

*** Corresponding author**

E-mail: janerenner@unisc.br

(J. D. P. Renner)

ABSTRACT

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques are considered promising in detecting genes involved in bacterial resistance, since they are fast and reliable methodologies, helping the ideal choice and early onset of adequate therapy. The aim of this study was to standardize real-time PCR reactions for detection of main resistance genes of Gram-positive and negative bacteria. Bacterial DNA was extracted by the alkaline lysis washing method. The real-time PCR technique using the fluorescence compound Sybr Green was standardized for resistance genes of Gram-positive bacteria (resistance to methicillin (*bla_{mecA}*) and vancomycin (*bla_{vanA}*) and resistance genes of Gram-negative bacteria class A Serine-β-lactamases (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*; *bla_{KPC}*) and the Metallo-β-lactamases (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}* e *bla_{NDM}*). It was possible to standardize the real-time PCR technique for the detection of resistance genes *bla_{mecA}* and *bla_{vanA}* of Gram-positive bacteria and Gram-negative producing class A Serine-β-lactamases and Metallo-β-lactamases. In addition,

it was possible to standardize a multiplex reaction for three resistance genes of Gram-negative producing Metallo- β -lactamases, in order to optimize the technique to reduce costs.

Key words

Molecular Diagnostic Techniques; Real-time PCR; Bacterial Genes; MDR genes.

CAPÍTULO III
CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Foi possível realizar o levantamento epidemiológico das ICS em pacientes internados na UTI neopediátrica do Hospital Santa Cruz, no ano de 2016, observou-se que as ICS foram prevalentes em recém-nascidos prematuros (<34 semanas de gestação), com até 28 dias de vida (neonatais), do sexo feminino e com baixo peso ao nascer (média de 1.619,42 gramas); foi possível verificar que houve associação entre a prematuridade do bebê com a presença de fatores de risco maternos, tais como comorbidades prévias e/ou intercorrência durante a gestação; o agente patogênico mais associado as ICS foi o *Staphylococcus* coagulase negativa, os quais apresentaram alta taxa de resistência à oxacilina;

- Foi possível realizar o levantamento epidemiológico das ICS em pacientes internados na UTI adulto do Hospital Santa Cruz, no ano de 2016, observou-se que as ICS ocorreram em maior frequência em pacientes idosos (≥ 60 anos) e do sexo masculino; a presença de patologia cardíaca prévia foi associada ao desfecho clínico desfavorável, para aqueles pacientes que foram acometidos por ICS na UTI adulto; a maioria das ICS foram de origem nosocomial, porém não foram associadas com o uso de dispositivos médicos invasivos, sugerindo ser em decorrência de contaminação cruzada; o agente patogênico mais associado as ICS foi o *Staphylococcus* coagulase negativa, os quais apresentaram alta taxa de resistência à oxacilina;

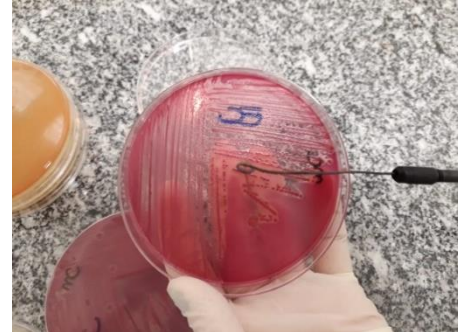
- Foi possível padronizar técnica de QPCR *uniplex* Gram específica, pelo sistema *TaqMan*, em cepas padrão e em isolados clínicos; a QPCR *TaqMan* apresentou especificidade e sensibilidade analítica nos ensaios realizados;

- Foi possível padronizar técnicas de QPCR *uniplex*, com o fluoróforo *Sybr Green*, para dois genes de resistência em bactérias Gram positivas (*bla_{mecA}* e *bla_{vanA}*) e cinco genes em bactérias Gram negativas (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*); foi possível padronizar técnicas de QPCR *multiplex* para três genes de bactérias Gram negativas produtoras de metalo- β -lactamase (*bla_{IMP}*, *bla_{SPM}* e *bla_{NDM}*), utilizando o composto fluorescente *Sybr Green*.

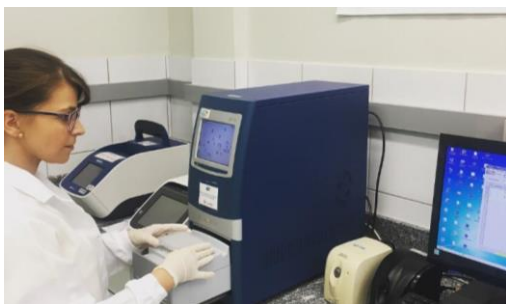
CAPÍTULO IV
NOTA À IMPRENSA

A AMEAÇA DAS BACTÉRIAS RESISTENTES E TÉCNICAS MOLECULARES PARA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO

As infecções hospitalares, hoje conhecidas como infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), prejudicam muito o quadro clínico dos pacientes, resultando em grande número de mortes. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no Brasil, 14% das internações evoluem para alguma IRAS. A estimativa mundial é que aproximadamente 234 milhões de indivíduos realizam algum procedimento cirúrgico por ano, em que um milhão morrem em decorrência de algum processo infeccioso. Além disso, o número de bactérias resistentes aos antibióticos é crescente, originando infecções bacterianas graves e aumentando, ainda mais, as taxas de óbitos, uma vez que estamos ficando sem opções de antibióticos para tratamento eficaz.



Diante deste preocupante cenário, foi realizado, na Universidade de Santa Cruz do Sul, um estudo que teve como objetivo verificar a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea e desenvolver métodos moleculares no diagnóstico de infecções e de genes envolvidos na resistência antimicrobiana. A pesquisa é resultado da dissertação na mestranda Betina Brixner, sob orientação da Dra. Jane Dagmar Pollo Renner e divulga os resultados de um estudo maior, intitulado “Desenvolvimento de métodos moleculares no diagnóstico de microrganismos e genes envolvidos na resistência bacteriana”.



Através dos resultados obtidos, foi possível verificar que as infecções da corrente sanguínea nas unidades de terapia intensiva adulto e neopediátrica, de um hospital de ensino no interior do Rio Grande do Sul, foram causadas, na maioria das vezes, pelo *Staphylococcus* coagulase negativa resistente. Esta é uma bactéria encontrada na microbiota normal da pele dos indivíduos, mas que possui envolvimento com casos de IRAS e, por isso, grande importância clínica. Além disso, através de metodologias moleculares, foi possível discriminar onze isolados microbiológicos e dez genes de resistência em curto período de tempo. Os pesquisadores destacam que esta metodologia possui alta sensibilidade e especificidade, auxilia no rápido diagnóstico e contribui para a segurança dos pacientes, ajudando na escolha do antibiótico adequado, na redução da resistência bacteriana, bem como reduzindo o tempo de internação e dos gastos hospitalares.

CAPÍTULO IV
RELATÓRIO DE CAMPO

RELATO DE CAMPO

O presente estudo abrange características interdisciplinares. Na coleta de dados epidemiológicos (etapa 1), contamos com o apoio de profissionais farmacêutico, enfermeiro e graduandos do curso de medicina. Já, na etapa 2, a extração de DNA e realização da PCR, bem como as demais análises e processamento dos resultados, foram realizadas por farmacêuticos, biólogos e graduandos dos cursos de farmácia, biologia e biomedicina.

No intuito de alcançar os objetivos propostos no projeto de pesquisa, este estudo foi dividido em duas partes: 1) Estudo epidemiológico e microbiológico, a fim de verificar qual o perfil das infecções de corrente sanguínea, bem como os fatores de risco dos pacientes críticos que podem predispor a desenvolver esta infecção; 2) Padronização/desenvolvimento de técnicas de QPCR para identificação de bactéria Gram positivas e negativas (sistema *TaqMan*) e detecção dos genes envolvidos na resistência antimicrobiana (*Sybr Green*).

Saliento que as coletas dos dados retrospectivos, de pacientes com diagnóstico de ICS no hospital em estudo, ocorreram conforme programado com o cronograma, sem nenhum contratempo ou dificuldade. Porém, deixo aqui registado a complexidade das padronizações das técnicas propostas no projeto de pesquisa, bem como o meu grande empenho, assim como de minha orientadora, bolsistas e demais profissionais envolvidos neste projeto, para alcançar seu êxito.

Primeira etapa

Para este estudo transversal e retrospectivo não foi encontrado nenhuma intercorrência durante a coleta dos dados e não foi necessário nenhum ajuste no projeto de pesquisa. A pesquisa foi realizada no segundo semestre de 2017, com início em junho e término em novembro. Além disso, a mestrandia reservou de um a dois turnos semanais, conforme disponibilidade de computador, para coleta de dados na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

Inicialmente, o Laboratório Santa Cruz disponibilizou uma lista com todas as hemoculturas realizadas no ano de 2016, após foram identificadas e destacadas somente aquelas que eram de origem das UTI Adulto e Neopediátrica do hospital. Através do sistema informatizado (MV 2000[®]) do hospital, foi realizada uma busca ativa utilizando a identificação do paciente no Sistema de Gerenciamento de Unidades (PAGU) e Sistema de Controle de Infecção Hospitalar (PSIH). As informações coletadas foram descritas em um *checklist*, previamente elaborado no projeto de pesquisa. Por fim, os dados foram tabulados no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS)

versão 23.0, em que foram analisadas a estatística descritiva das variáveis (frequências, médias e desvio padrão) e associações entre as variáveis categóricas, através do teste de Qui Quadrado.

Cabe ressaltar que, dos dados coletados nesta etapa, foi possível redigir dois manuscritos, que ambos se encontram submetidos.

Segunda etapa

Esta etapa foi iniciada no mês de outubro de 2017. Para iniciar a etapa de padronização do método de QPCR, precisamos, antecipadamente, realizar as técnicas microbiológicas com a preparação de meios de cultivos, coloração de Gram e provas bioquímicas, para auxiliar na correta identificação das bactérias e verificar se não havia presença de contaminantes nas amostras. Após a semeadura e isolamento de diversas bactérias, optou-se por trabalhar inicialmente com cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa), a fim de verificar se os *primers* e *probes* funcionavam corretamente, para posteriormente seguir as análises com outras bactérias. Já, para a resistência bacteriana, foram utilizadas amostras clínicas que possuíam a presença de genes estudados. A seguir serão descritas todas as etapas de padronização e desenvolvimento das técnicas de QPCR.

Padronização do protocolo de extração de DNA de cepas padrão

A padronização deste protocolo foi desafiadora, na qual foram testadas quatro diferentes formas de extração, buscado identificar um DNA em quantidade suficiente para a realização das técnicas e de boa qualidade. Testou-se inicialmente a técnica de extração por fervura, porém foi possível observar em gel de agarose 1% e quantificação no Qubit[®] e NanoDrop[®] que o DNA extraído estava degradado, com impurezas e de má qualidade. O segundo método testado foi a extração por lise alcalina, a qual apresentou, após algumas modificações no método, um DNA com maior qualidade e, apesar da quantificação de DNA ter sido menor quando comparado com a primeira técnica de extração, o DNA encontrava-se com menos impurezas. A terceira técnica testada foi o Kit de extração *in house* CPTBio e os padrões foram semelhantes ao encontrado com o segundo método, porém o DNA degradava mais rapidamente quando descongelado para uso nas reações de QPCR. Por fim, realizamos a tentativa de extração do DNA pelo Kit comercial *Purelink Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher[®]), obtendo uma quantidade menor de DNA, quando comparado ao método de lise alcalina, porém mais íntegro e de boa qualidade.

Como o intuito do projeto era desenvolver uma técnica de baixo custo, optou-se por trabalhar com a extração de lise alcalina, uma vez que apresentou bons resultados nas reações de QPCR.

Além disso, é uma técnica bem mais barata quando comparada ao Kit comercial testado, cujo valor para 50 preparações custa aproximadamente 660,00 reais.

Ressalta-se que para a padronização da técnica de extração de DNA, foram necessários meses até a definição do melhor método. Para cada técnica foi necessário realizar ajustes, buscando alcançar uma melhor extração de DNA bacteriano, em que alguns casos as etapas se diferenciaram para bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Padronização da QPCR pelo sistema *TaqMan* de cepas padrão

Esta etapa iniciou na segunda quinzena de dezembro de 2017 e demandou muito esforço, tempo e tentativas para conseguir alcançar seu êxito. Durante a padronização desta técnica houve diversos erros que desafiaram os pesquisadores, sendo necessário buscar ajuda com outros professores e, até mesmo, a assistência científica da empresa Thermo Fisher[®], a qual produz os reagentes utilizados nesta reação de QPCR.

O primeiro desafio foi a escolha do método da configuração do aparelho *StepOne Plus*[®]. Como a literatura utilizada como base para padronização da técnica não descrevia a configuração do aparelho, depois de conversa com professores, optou-se pelo método de “presença/ausência”. Após meses de tentativa, com DNA extraídos pelos três primeiros métodos de extração, com quantidades diferentes de DNA, *primers* e *probes*, conseguiu-se a padronização da reação *uniplex*. Em seguida, iniciou-se os testes para reação *multiplex*, em que foram realizadas diversas tentativas de padronização, com as mesmas mudanças de quantidade de reagentes e DNA que as realizadas na *uniplex*, porém sem sucesso. A fim de verificar o porquê da impossibilidade desta técnica *multiplex*, entramos em contato com a assessoria científica da Thermo Fisher[®], a qual indicou uma nova configuração para realizar as análises.

Passadas algumas semanas realizando as PCRs pela configuração *multiplex* “presença/ausência”, iniciamos com a técnica de padronização pela nova configuração “curva padrão”. Foram necessárias tentativas com quantidades diferentes de DNA extraídos pelo método de lise alcalina e diferentes concentrações de *primers* e *probes*, até que conseguíssemos a padronização da reação *uniplex*.

Após, prosseguimos a padronização da técnica *multiplex*, em que as concentrações dos reagentes e quantidade de DNA foram os mesmos que na *uniplex*. Prosseguiu-se para as análises de sensibilidade (variando de 10 ng/μL até 1 μg/μL) e especificidade (cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*). Nesta etapa, encontramos um grande empecilho que atrasou muito as análises. A *probe* FAM (que identifica bactérias Gram positivas) parou de amplificar na reação de

PCR *multiplex*, sendo necessário verificar e realizar uma nova padronização desta PCR. Novas *probes* e *primers* foram diluídos, a água foi trocada, concentrações de reagentes alteradas, confecção de novo kit de extração de lise alcalina e, após semanas de tentativas e erros, não foi possível verificar a amplificação dessa *probe* na reação *multiplex*, amplificando somente quando se encontrava em uma reação *uniplex*.

Neste mesmo período chegou o Kit comercial, que havíamos encomendado meses antes, sendo realizada uma nova extração. Realizamos novas reações, com diferentes concentrações de reagentes, porém também não obtivemos êxito na padronização *multiplex*. Após discussão com orientadora e, em virtude curto período que havíamos até a defesa da dissertação e gastos dos reagentes, optou-se por trabalharmos com a técnica de PCR *uniplex*, previamente padronizada. Além disso, a reação com somente uma *probe* foi mais sensível do que quando haviam dois alvos diferentes na mesma reação.

Padronização do protocolo de extração de DNA do sangue

A padronização deste protocolo de difícil execução, uma vez que tivemos que nos deter principalmente na extração do DNA bacteriano e não do DNA humano. Foram necessários voluntários saudáveis para de doação de sangue para posterior contaminação, na escala de 0,5 de McFarland, com as cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) de bactérias Gram positiva e negativa. As extrações de DNA foram realizadas por dois métodos. Foram extraídos DNA por lise alcalina modificada e pelo Kit comercial *Purelink Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher®). Quando o sangue foi contaminado com colônias bacterianas, o kit comercial apresentou a melhor extração, com um DNA íntegro, sem impurezas e de boa qualidade, verificado em gel de agarose 1% e quantificação no Qubit® e NanoDrop®. Desta maneira, optou-se por testar o DNA extraído do plasma e do sangue total para posterior análise na PCR de qual seria o melhor e com menos interferência do DNA presente no sangue humano, na reação de QPCR.

Além disso, foram extraídas amostras de hemoculturas positivas de pacientes internados na UTI adulto, cedidas gentilmente pelo Laboratório Santa Cruz. Para essas amostras, também foram testados os dois métodos de extração descritos anteriormente. Verificou-se através do gel de agarose 1% e quantificação no Qubit® e NanoDrop®, que a extração por lise alcalina foi o melhor método para extrair DNA dessa amostra.

Padronização da QPCR pelo sistema *TaqMan* do sangue

Esta etapa iniciou na segunda quinzena de agosto de 2018, a qual demandou trabalho árduo e um desafio enorme para a equipe de pesquisa. Testamos primeiramente por PCR convencional, para verificarmos se aquele DNA extraído continha DNA bacteriano. Após seguimos para a QPCR *uniplex*, utilizando a *probe* NED (controle endógeno), com a FAM e a VIC; porém, não obtivemos sucesso com as amostras extraídas do plasma e, também, do sangue total. Foram realizadas diversas tentativas, com diferentes concentrações de *primers* e *probes*, diferentes temperaturas de anelamento e, até o momento, não foi possível concluir a padronização da QPCR no sangue com amostras de sangue total/plasma.

Verificando na literatura, realizamos a tentativa de padronização da técnica com amostras de hemoculturas positivas. Utilizando este material, foi possível identificar bactérias Gram positivas, não sendo executado os testes para Gram negativas devido à falta de amostras de hemoculturas positivas para essas bactérias.

Padronização da QPCR utilizando fluoróforo *Sybr Green* para genes de resistência

Iniciada em setembro de 2018, as técnicas de padronização dos genes de resistência bacteriana (*bla_{CTX-M}*, *bla_{C_{SHV}}*, *bla_{TEM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{mecA}* e *bla_{vanA}*), foram realizadas sem grande dificuldade. Primeiramente, a técnica foi padronizada utilizando isolados clínicos previamente semeados em placas de Müller Hinton. Já no sangue, até o momento, conseguiu-se padronizar através de hemocultura positiva a presença do gene *mecA* para amostra previamente identificada como Gram positiva.

Cabe ressaltar que, para ambas padronizações, foram utilizados o DNA extraído pelo método de lise alcalina e que para os genes *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{NDM}* já se tem uma reação *multiplex* padronizada.

Soluções reagentes

Apesar de alguns percalços que tivemos ao longo da pesquisa, saliento que houve grande demora no recebimento de diversas soluções reagentes. A grande maioria levada aproximadamente 4 meses para chegar ao laboratório após encomenda, o que atrasou a pesquisa e as padronizações das técnicas sugeridas no projeto de pesquisa.

Cabe ressaltar que os Kits de extração comercial chegaram com o prazo de validade muito próximo do vencimento. Com isso, foram devolvidos dois Kits de extração, o que limitou a

extração de DNA para 50 amostras. Além disso, durante os experimentos de bancada houve término e demora na entrega nos seguintes itens: solução Master Mix *TaqMan*, DNase I, lisozima, reagentes para quantificação de DNA no Qubit[®], tubos do tipo *strip* e tiras de tampa para estes tubos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHIAU, S.; LARSON, E. L. Repeat gram-negative hospital-acquired infections and antibiotic susceptibility: A systematic review. *Journal of Infection and Public Health*, v. 11, n. 4, p. 455-462, 2018.
- AHMAD, A. et al. Diagnosis of paediatric sepsis by automated blood culture system and conventional blood culture. *Journal of Pakistan Medical Association*, v. 67, n. 2, p. 192-195, 2017.
- ALBUQUERQUE, C. F. G. et al. Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* associated lung disease. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 306, n. 1, p. 20-28, 2016.
- ASATI, S.; CHAUDHARY, U. Prevalence of biofilm producing aerobic bacterial isolates in burn wound infections at a tertiary care hospital in northern India. *Annals of Burns and Fire Disasters*, v. 30, n. 1, p. 39-42, 2017.
- BALLOUZ, T. et al. Risk factors, clinical presentation, and outcome of *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 156, 2017.
- BAMMIGATTI, C. et al. Healthcare associated infections in a resource limited setting. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 1, p. OC01-OC04, 2017.
- BOKAEIAN, M. et al. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-m genes in resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended spectrum β -lactamases. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 8, n. 1, p. e13783, 2015.
- BRASIL. Portaria n. 2.616 de 12 de maio de 1998. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- BRIXNER, B.; RENNER, J. D. P.; KRUMMENAUER, E. C. Contaminação ambiental da UTI pediátrica: fator de risco para a ocorrência de infecções oportunistas? *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 6, n. 1, P. 24-28, 2016.
- CARLESSE, F. et al. Clinical relevance of molecular identification of microorganisms and detection of antimicrobial resistance genes in bloodstream infections of paediatric cancer patients. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 462. 2016.
- CHAN, K. Y. et al. Rapid identification and differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants. *Critical Care Medicine*, v. 37, n. 8, p. 2441-2447, 2009.
- CHUNG, Y. et al. Usefulness of multiplex real-time PCR for simultaneous pathogen detection and resistance profiling of Staphylococcal bacteremia. *BioMed Research International*, v. 2016, ID 6913860, 7 páginas, 2016.
- DAL-BÓ, K.; SILVA, R. M.; SAKAE, T. M. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit in South Brazil. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 24, n. 4, p. 381-385, 2012.

- DARK, P. et al. The clinical diagnostic accuracy of rapid detection of healthcare-associated bloodstream infection in intensive care using multipathogen real-time PCR technology. *BMJ Open*, v.1, n. 1, p. e000181, 2011.
- DE LA ROSA, G.; LEÓN, A. L.; JAIMES, F. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, v. 33, n. 2, p. 141-149, 2016.
- DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Critical Care Medicine*, v, 41, n.2, p. 580-637, 2013.
- DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 3, p. 222-235, 2007.
- DIAMENT, D. et al. Guidelines for the treatment of severe sepsis and septic shock – management of the infectious agent – diagnosis. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 2, p. 134-144, 2011.
- DINÇ, F. et al. Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis. *Minerva Anestesiologica*, v. 82, n. 3, p. 301-309, 2016.
- DOI, Y.; MURRAY, G. L.; PELEG, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 36, n. 1, p. 85–98, 2015.
- DREIER, J.; RUGGERONE, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 660, 2015.
- DUESING, L. A.; FAWLEY, J. A.; WAGNER, A. J. Central venous access in the pediatric population with emphasis on complications and prevention strategies. *Nutrition in Clinical Practice*, v. 31, n. 4, p. 490–501, 2016.
- ECKER, D. J. et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 10, n. 4, p. 399-415, 2010.
- EVERETT, J. et al. Arginine is a critical substrate for the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *mBio*, v. 8, n. 2, p. e02160-16, 2017.
- FRAM, D. et al. Risk factors for bloodstream infection in patients at a Brazilian hemodialysis center: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, p. 158, 2015.
- FREIRE, M. P. et al. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 4, p. 352–358, 2016.
- FOÀ, C. et al. Hand hygiene in health care settings: the citizens' point of view. *Acta Biomedica*, v. 88, n. 1-S, p. 40-53, 2017.

FORTALEZA, C. M. et al. Tropical healthcare epidemiology: weather determinants of the etiology of bloodstream infections in a Brazilian hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 35, n. 1, p. 85-88, 2014.

GALAL, Y. S.; YOUSSEF, M. R.; IBRAHIEM, S. K. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors and outcome in paediatric intensive care units at Cairo University Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research for Doctors*, v. 10, n. 6, p. SC06–SC11, 2016.

GALVIN, S. et al. Microbial monitoring of the hospital environment: why and how? *Journal of Hospital Infection*, v. 82, n. 3, p. 143-151, 2012.

GAO, J. et al. Antibiotic resistance and OXA-type carbapenemases-encoding genes in airborne *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wards. *Burns*, v. 40, n. 2, p. 295–299, 2014.

GARCÍA, H. et al. Risk factors for central line-associated bloodstream infection in critically ill neonates. *The Indian Journal of Pediatrics*, v. 86, n. 4, p. 340-346, 2019.

GARCÍA, H.; MARTÍNEZ, M. A. N.; PEREGRINO, B. L. Epidemiology of nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, v. 52, p. S30-37, 2014.

G/EYESUS, T. et al. Bacterial etiologic agents causing neonatal sepsis and associated risk factors in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics*, v. 17, n. 1, p. 137, 2017.

GRAHAM, Philip L. Simple strategies to reduce healthcare associated infections in the neonatal intensive care unit: line, tube, and hand hygiene. *Clinics in Perinatology*, v. 37, n. 3, p. 645–653, 2010.

GUDIOL, C.; AGUADO, J. M.; CARRATALÀ, J. Bloodstream infections in patients with solid tumors. *Virulence*, v. 7, n. 3, p. 298-308, 2016.

GUPTA, M. D. et al. Ribosomal RNA-based panbacterial polymerase chain reaction for rapid diagnosis of septicemia in Intensive Care Unit patients. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 219-221, 2016.

HAMMERUM, A. M. et al. Emergence of *vanA* Enterococcus faecium in Denmark, 2005-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 8, p. 2184-2190, 2017.

HAVAEI, S. A. et al. Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in MRSA strains. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 161-167, 2015.

IOVLEVA, A.; DOI, Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 37, n. 2, p. 303-315, 2017.

IWERIEBOR, B. C.; OBI, L. C.; OKOH, A. I. Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. *BMC Microbiology*, v. 15, p. 136, 2015.

JACOBS, M. R. et al. Multicenter Clinical Evaluation of BacT/ALERT VIRTUO Blood Culture System. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 2413-2421, 2017.

JEUKENS, J. et al. Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Artigo IN PRESS, 2017.

KAYE, K. S. et al. Effect of nosocomial bloodstream infections on mortality, length of stay, and hospital costs in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 62, n. 2, p. 306-311, 2014.

KIM, C. et al. The mechanism of heterogeneous betalactam resistance in MRSA: Key role of the stringent stress response. *PLoS One*. v. 8, n. 12, p. e82814, 2013.

KOUNI, S. et al. Establishing nationally representative central line-associated bloodstream infection surveillance data for paediatric patients in Greece. *Journal of Hospital Infection*, v. 101, n. 1, p. 53-59, 2019.

KRAKER, M. E. A. et al. Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 2, p. 398-407, 2011.

KOMATSU, Y. et al. Molecular epidemiology and clinical features of extended-spectrum beta-lactamase- or carbapenemase-producing *Escherichia coli* bacteremia in Japan. *PLoS One*, v. 13, n. 8, p. e0202276, 2018.

KORBER, F. et al. SeptiFast versus blood culture in clinical routine - A report on 3 years experience. *Wien Klin Wochenschr*. v. 129, n. 11-12, p. 427-434, 2017.

LAU, J. S. Y. et al. Surveillance of life-long antibiotics: a review of antibiotic prescribing practices in an Australian Healthcare Network. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 16, n. 1, p. 3-7, 2017.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 55, 2017.

LEVINSON, Warren. Cocos Gram-positivos. In: _____. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010a. p. 113-125.

LEVINSON, Warren. Bacilos Gram-negativos relacionados ao trato intestinal. In: _____. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010b. p. 140-157.

LIM, S. J. et al. Intensive care unit-acquired blood stream infections: a 5-year retrospective analysis of a single tertiary care hospital in Korea. *Infection*, v. 42, n. 5, p. 875-881, 2014.

- LIN, H. H. et al. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46, n. 1, p. 48-52, 2013.
- LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*. v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014.
- LIU, C. F. et al. Rapid diagnosis of sepsis with TaqMan-Based multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 32, n. 2, 2018.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.
- LIVERMORE, David M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.
- LOB, S. H. et al. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 47, n. 4, p. 317–323, 2016.
- LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G.; CLARK, N. M. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 38, n. 3, p. 311-325, 2017.
- MANGINI, C. et al. Infecção da corrente sanguínea. In: BARBANO, D. B. A. et al. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 1 ed. 2013.
- MARCO, D. et al. Magicplex™ Sepsis Real-Time test to improve bloodstream infection diagnostics in children. *European Journal of Pediatrics*, v. 175, n. 8, p. 1107–1111, 2016
- MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.
- MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 271-280.
- MAURO, M. V. et al. Diagnostic utility of LightCycler SeptiFast and procalcitonin assays in the diagnosis of bloodstream infection in immunocompromised patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, n. 4, p. 308-311, 2012.
- MCCANN, C. D. et al. Evaluation of Real-time PCR and Pyrosequencing for Screening Incubating Blood Culture Bottles from Adults with Suspected Bloodstream Infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 81, n. 3, p. 158–162, 2015.
- MOORE, J. E.; MASTORIDIS, P. Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 42, n. 3, p. 259-267, 2017.

MORAES, G. M. et al. Infecção ou colonização por micro-organismos resistentes: identificação de preditores. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 26, n. 2, p. 185-191, 2013.

NEO, Jun Rong Jeffrey. Construct validity - Current issues and recommendations for future hand hygiene research. *American Journal of Infection Control*, v. 45, n. 5, p. 521-527, 2017.

NOUETCHOGNOU, J. S. et al. Surveillance of nosocomial infections in the Yaounde University Teaching Hospital, Cameroon. *BMC Research Notes*, v. 9, n. 1, p. 505, 2016.

OBENG-NKRUMAH, N. et al. Trends in paediatric and adult bloodstream infections at a Ghanaian referral hospital: a retrospective study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 15, n. 1, p. 49-59, 2016.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, v. 24, n. 8, p. 217-230, 2015.

OLUYEGE, A. O. et al. Isolation and Characterization of *Salmonella typhi* from Widal Positive Patients Attending Ekiti State University Teaching Hospital. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, n. 10, p. 774-84, 2015.

OPLUSTIL, C. P. et al. Hemocultura. In:_____. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. 3.ed. Florianópolis: Editora Sarvier, 2010. p. 206-223.

OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 10, n. 4, p. 227-239, 2010.

ÖZGÜR, E. S. et al. Ventilator-associated pneumonia due to extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors, clinical features, and outcomes. *American Journal of Infection Control*, v. 42, n. 2, p. 206–208, 2014.

PARSA, H.; SAMANI, S. Microbiological Features and Risk Factors in Patients With Diabetic Foot Ulcers. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*, v. 27, n. 11, p. 308-312, 2015.

PHIL, O. U. M. et al. Antibiotic Sensitivity pattern of Bacterial Isolates of Neonatal Septicemia in Peshawar, Pakistan. *Archives of Iranian Medicine*, v. 19, n. 12, p. 866-889, 2016.

POOLE, Keith. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, p. 65, 2011.

POOLE, S.; KIDD, S. P.; SAEED, K. A review of novel technologies and techniques associated with identification of bloodstream infection etiologies and rapid antimicrobial genotypic and quantitative phenotypic determination. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 18, n. 6, p. 543-555, 2018.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 45, n. 6, p. 568–585, 2015.

PROWLE, J. R. et al. Acquired bloodstream infection in the intensive care unit: incidence and attributable mortality. *Critical Care*, v.15, n. 2, p. R100, 2011.

PUNIA, H. et al. Diagnosis of neonatal sepsis using 16S rRNA polymerase chain reaction. *Tropical Doctor*, v. 47, n. 4, p. 336-339, 2017.

QUILES, M. G. et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 283, 2015.

RIZEK, C. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 13, n. 1, p. 43, 2014.

RODRIGUES, J. et al. Multidimensional Strategy Regarding the Reduction of Central-Line Associated Infection in Pediatric Intensive Care. *Acta Médica Portuguesa*, v. 29, n. 6, p. 373-380, 2016.

RUSSOTTO, V. et al. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care*, v. 3, n. 1, p. 54, 2015.

RUTKOWSKA, K.; PRZYBYŁA, M.; MISIOŁEK, H. Healthcare-associated infections in a newly opened intensive care unit. *Anaesthesiology Intensive Therapy*, v. 45, n. 2, p. 62–66, 2013.

SALAMA, M. F. et al. Implementation of central venous catheter bundle in an intensive care unit in Kuwait: Effect on central line-associated bloodstream infections. *Journal of Infection and Public Health*, v. 9, n. 1, p. 34-41, 2016.

SAMPAIO, J. L.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47 Supl. 1, p. 31-37, 2016.

SANTOLAYA, M. E. et al. Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer: microbiologic and molecular approach. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 30, n. 11, p. 957-961, 2011.

SCERBO, M. H. et al. Beyond blood culture and gram stain analysis: a review of molecular techniques for the early detection of bacteremia in surgical patients. *Surgical Infections*, v. 17, n. 3, p. 294-302, 2016.

SCHELENZ, S.; NWAKA, D.; HUNTER, P. R. Longitudinal surveillance of bacteraemia in haematology and oncology patients at a UK cancer centre and the impact of ciprofloxacin use on antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 6, p. 1431-1438, 2013.

SHOKOUHI S. et al. Genotypic Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. In Tertiary Center, Iran. *Infectious Disorders - Drug Targets*, v. 17, n. 2, p. 90-94, 2017.

SKOV, D. L. et al. Risk and prognosis of bloodstream infections among patients on chronic hemodialysis: a population-based cohort study. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0124547, 2015.

SOUSA, M. A. S. et al. Prevalência de infecção da corrente sanguínea em idosos internados em um Hospital Geral. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 1, n. 3, p. 11-17, 2015.

SRISAN, P.; JUHONG, S.; KANJANAPATANAKUL, W. Central venous catheterization related complications in Pediatric Intensive Care Unit at Queen Sirikit National Institute of Child Health. *Journal of the Medical Association of Thailand*, v. 97, Supl 6, p. S83-88, 2014.

SITNIK, R. et al. Uso do SeptiFast para diagnóstico de sepse em doentes graves de um hospital brasileiro. *Einstein*, v. 12, n. 2, p. 191-197, 2014.

STOCCO, J. G. D. et al. Second-Generation central venous catheter in the prevention of bloodstream infection: a systematic review. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 24, p. e2722, 2016.

SURASE, P. V. et al. An Appropriately Performed Conventional Blood Culture Can Facilitate Choice of Therapy in Resource-Constrained Settings-Comparison with BACTEC 9050. *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 62, n. 4, p. 228-234, 2016.

SUZUKI, M. et al. Bacteremia in hemodialysis patients. *World Journal of Nephrology*, v. 5, n. 6, p. 489-496, 2016.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 175-182.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; TRABULSI, L. R. *Enterococcus faecalis*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 215-220.

TESTONI, D. et al. Late-onset bloodstream infections in hospitalized term infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 33, n. 9, p. 920-923, 2014.

TOFAS, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 88, n. 4, p. 335-341, 2017.

VENTO, S.; CAINELLI, F.; TEMESGEN, Z. Lung infections after cancer chemotherapy. *The Lancet Oncology*, v. 9, n. 10, p. 982-992, 2008.

VENTURINI, E. et al. Central-line associated bloodstream infections in a tertiary care children's University hospital: a prospective study. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 725, 2016.

VERGARA, T.; VÉLIZ, E.; FICA, A. Los días de exposición a nutrición parenteral aumentan el riesgo de bacteriemia asociada a catéter venoso central. *Revista Chilena de Infectología*, v. 33, n. 6, p. 603-608, 2016.

XIA, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence. *BioScience Trends*, v. 7, n. 3, p. 113-121, 2013.

WANG, H. Y. et al. Real-time PCR taqman assay for rapid screening of blood stream infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v 13, n. 1, p. 3, 2014.

WILLIAMS, M. D. et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. *Critical Care*, v. 8, n. 5, p. R291-R298, 2004.

YANAT, B.; MARTÍNEZ, J. M. R.; TOUATI, A. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 421-435, 2017.

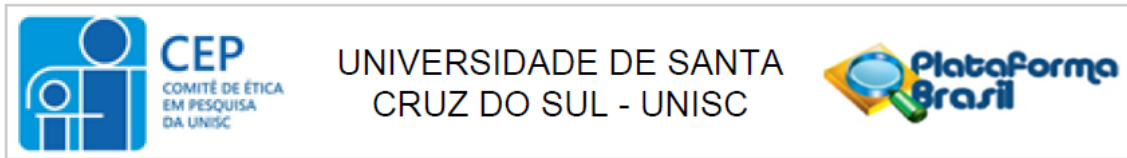
YUE, D. M. et al. Hospital-wide comparison of health care-associated infection among 8 intensive care units: A retrospective analysis for 2010-2015. *American Journal of Infection Control*, v. 45, n. 1, p. e7-e13, 2017.

ZBOROMYRSKA, Y. et al. Rapid diagnosis of Staphylococcal catheter-related bacteraemia in direct blood samples by Real-Time PCR. *PLoS One*, v. 11, n. 8, p. e0161684, 2016.

ZHANG, J. et al. Organism-specific bacteremia by hemodialysis access. *Clinical Nephrology*, v. 86, n. 9, p. 141–146, 2016.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E DE GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Pesquisador: JANE DAGMAR POLLO RENNER

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55494716.3.0000.5343

Instituição Proponente: Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.540.110

Apresentação do Projeto:

Atualmente, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas um dos grandes problemas de saúde pública, com impacto no tempo de internação, na morbimortalidade e gastos com procedimentos terapêuticos e diagnósticos. Acrescenta-se a isso as repercussões para o paciente, sua família e a comunidade em geral, tal como o afastamento do trabalho e da vida social, com consequente comprometimento

psicológico, econômico e social. A infecção ou colonização por microrganismos resistentes em pacientes hospitalizados tem merecido crescente atenção dos serviços de controle de infecção hospitalar. O impacto dessa complicação infecciosa no ambiente hospitalar se traduz por prolongamento da hospitalização, incapacidade para o trabalho, reinternações aumento de custo, sequelas e óbito. Não há estimativas exatas do impacto mundial dessas infecções, mas nos Estados Unidos, mais de 70% das bactérias isoladas nos hospitais são resistentes a pelo menos um antibiótico comumente utilizado no tratamento da infecção. O isolamento bacteriano utilizando técnicas microbiológicas convencionais raramente ultrapassa 25% com sinais clínicos e achados laboratoriais sugestivos de infecção bacteriana invasiva. Também é interessante notar que em 40% das crianças que têm um diagnóstico clínico de sepse e 75% dos casos de neutropenia febril de alto risco, não pode ser detectado os

Endereço: Av. Independência, nº 2293 -Bloco 6, sala 603

Bairro: Universitario

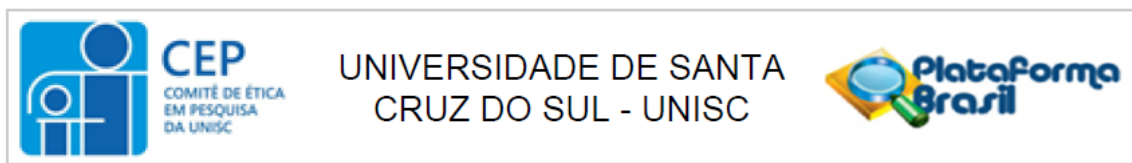
CEP: 96.815-900

UF: RS

Município: SANTA CRUZ DO SUL

Telefone: (51)3717-7680

E-mail: cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.540.110

microrganismos por técnicas microbiológicas convencionais. As técnicas moleculares que detectam os ácidos nucleicos para a identificação de patógenos tornaram-se cada vez mais disponíveis. Estas técnicas são sensíveis na detecção do DNA viral, bacteriano e fúngico no sangue periférico. Entre as técnicas moleculares mais promissoras está a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A mudança de padrões de susceptibilidade antimicrobiana continua a ser uma das tarefas mais importantes de laboratórios de microbiologia clínica. A terapia antimicrobiana eficaz dos pacientes de doenças infecciosas é constantemente desafiado pelo rápido aumento da prevalência de agentes patogênicos resistentes e até mesmo resistentes a múltiplas drogas em todo o mundo. Em resposta às limitações dos métodos fenotípicos, outros testes de susceptibilidade antimicrobiana e antifúngica são continuamente desenvolvidos. Estes métodos podem identificar um agente patogênico e o seu perfil de susceptibilidade antimicrobiana dentro de um curto período de tempo. Por exemplo, PCR em tempo real quantitativo (qPCR), que torna possível detectar o microrganismo e a resistência em uma amostra biológica dentro de algumas horas, portanto, isso facilita iniciar o tratamento e controle de medidas adequadas para o paciente. Neste contexto, justifica-se o desenvolvimento de testes de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção de microrganismos relevantes e genes de resistência em ambientes hospitalares e em pacientes críticos, e assim, facilitar o tratamento reduzindo o tempo de permanência do paciente no hospital e a melhoraria da gestão de antimicrobianos.

Objetivo da Pesquisa:

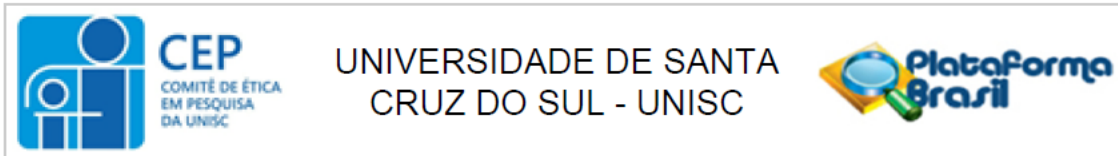
Objetivo Primário:

Desenvolver métodos moleculares no diagnóstico de doenças infecciosas e de genes envolvidos na resistência antimicrobiana.

Objetivo Secundário:

1. Identificar a prevalência de doenças infecciosas e de microrganismos resistentes isolados no ambiente hospitalar e ambulatorial na região de Santa Cruz do Sul;
2. Realizar testes fenotípicos para identificação presuntiva de resistências de microrganismos isolados de amostras biológicas e do ambiente;
3. Padronizar técnicas baseadas em biologia molecular para a identificação em amostras biológicas e isolados de bactérias Gram negativas como Enterobacteriaceae, Pseudomonas sp., Acinetobacter sp. e Gram positivas como

Endereço: Av. Independência, nº 2293 -Bloco 6, sala 603
Bairro: Universitário **CEP:** 96.815-900
UF: RS **Município:** SANTA CRUZ DO SUL
Telefone: (51)3717-7680 **E-mail:** cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.540.110

Staphylococcus sp., Streptococcus sp e

Enterococcus sp.;

4. Padronizar técnicas de identificação de genes de resistências de bactérias Gram negativas (ESBL, AMPc, MBL e KPC) e Gram

positivas (MecA, VanA e VanB)

5. Padronizar técnicas baseadas em biologia molecular para a identificação de isolados de Acanthamoeba spp e

seus genótipos dos ambientes como água e poeira do climatizador de ar hospitalar.

6. Identificar e caracterizar endossimbiontes, como

Legionella spp e Pseudomonas spp, presentes em Acanthamoeba em amostras de água e poeira de ambientes hospitalar;

7. Padronizar técnicas

baseadas em biologia molecular para a identificação de fungos emergentes como Candida albicans e Candida não albicans;

8. Padronizar

técnicas baseadas em biologia molecular para a identificação do CMV

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para os sujeitos da pesquisa, já que serão usadas uma parte das amostras biológicas que serão coletados para exames laboratoriais.

Benefícios:

Conhecer a microbiota existente nas mãos e mucosa nasal dos profissionais da saúde; padronizar um método que possibilite o diagnóstico

microbiológico (bactérias, fungos e vírus) e sua resistência mais precocemente em pacientes internados, facilitar o tratamento reduzindo o tempo de

permanência do paciente no hospital e a melhoria da gestão de antimicrobianos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de importância ímpar sobre identificação de bactérias, fungos e vírus e que auxiliará a padronizar procedimentos no HSC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Av. Independência, nº 2293 -Bloco 6, sala 603

Bairro: Universitario

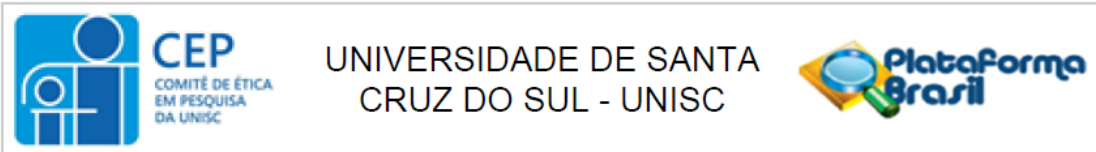
CEP: 96.815-900

UF: RS

Município: SANTA CRUZ DO SUL

Telefone: (51)3717-7680

E-mail: cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.540.110

Documentos obrigatórios estão adequados e em conformidade com a solicitação deste CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado e em condições de ser executado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_697044.pdf	20/04/2016 08:52:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	20/04/2016 08:52:03	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/04/2016 08:51:32	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/04/2016 08:26:59	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	lsc.pdf	12/04/2016 23:48:34	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aceitehsc.pdf	12/04/2016 23:42:05	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito
Cronograma	orcamento.pdf	12/04/2016 23:35:08	JANE DAGMAR POLLO RENNER	Aceito

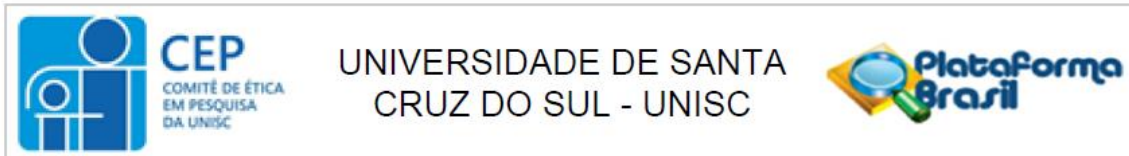
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Independência, nº 2293 -Bloco 6, sala 603
Bairro: Universitario **CEP:** 96.815-900
UF: RS **Município:** SANTA CRUZ DO SUL
Telefone: (51)3717-7680 **E-mail:** cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.540.110

SANTA CRUZ DO SUL, 11 de Maio de 2016

Assinado por:
Ingo Paulo Kessler
(Coordenador)

Endereço: Av. Independência, nº 2293 -Bloco 6, sala 603
Bairro: Universitario **CEP:** 96.815-900
UF: RS **Município:** SANTA CRUZ DO SUL
Telefone: (51)3717-7680 **E-mail:** cep@unisc.br

ANEXO B – Ficha UTI adulto

PESQUISA: Prevalência de infecções da corrente sanguínea e perfil epidemiológico dos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Adulto.

1. Registro Paciente: n.º		2. Atendimento: n.º	
3. Nome do Paciente:			
4. Idade:		5. Nasc.: ____/____/____	
6. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino			
7. Tipo de internação: (1) Clínica (2) Cirúrgica eletiva (3) Cirúrgica de urgência			
8. Data de internação: ____/____/____		9. Tempo de internação pré-UTI: ____ dias	
10. Data de internação na UTI: ____/____/____		11. Tempo de internação em UTI: ____ dias	
12. Data de internação pós UTI: ____/____/____		13. Tempo TOTAL de internação: ____ dias	
14. Data da alta/ transferência/Óbito: ____/____/____		15. Desfecho Clínico: (1) Alta (2) Transferência outro hospital (3) Óbito	
16. Sinais clínicos de infecção da corrente sanguínea: (1) Sim (2) Não			
17. Comorbidades: (1) Cardíaca (2) Pulmonar (3) Neurológica (4) Malignidade (5) Endocrinológica (6) Renal Aguda (7) Renal Crônica (8) Hepática (9) Imunodeficiência			
Observação: _____			
18. Uso de ATB antes da coleta da amostra: (1) Sim (2) Não			
19. Hemocultura positiva (1ª amostra): (1) Sim (2) Não ____/____/____		20. Hemocultura positiva (2ª amostra): (1) Sim (2) Não ____/____/____	
21. Microrganismo isolado:			
22. Drogas resistentes:			
23. Drogas sensíveis:			
24. Mecanismo de Resistência: (1) ESBL (2) KPC (3) NDM (4) MBL (5) MRSA (6) VRE			
25. Infecção ligada a dispositivo invasivo: (1) Sim (2) Não			
26. Infecção de origem: (1) Comunitária (2) Nosocomial			
27. Observações:			

Fonte: autora

ANEXO C –Ficha UTI neopediátrica

PESQUISA: Prevalência de infecções da corrente sanguínea e perfil epidemiológico dos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Neopediátrica

1. Registro Paciente: n.º		2. Atendimento: n.º	
3. Nome do Paciente:			
4. Idade:	5. Nasc.: ____/____/____	6. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino	
7. Data de internação: ____/____/____		8. Tempo de internação pré-UTI: ____ dias	
9. Data de internação na UTI: ____/____/____		10. Tempo de internação em UTI: ____ dias	
11. Data de internação pós UTI: ____/____/____		12. Tempo TOTAL de internação: ____ dias	
13. Data da alta/ transferência/Óbito: ____/____/____		14. Desfecho Clínico: (1) Alta (2) Transferência outro hospital (3) Óbito	
15. Sinais clínicos de infecção da corrente sanguínea: (1) Sim (2) Não			
16. Comorbidades: (1) Cardíaca (2) Pulmonar (3) Neurológica (4) Malignidade (5) Endocrinológica (6) Renal Aguda (7) Renal Crônica (8) Hepática (9) Imunodeficiência (10) Prematuridade			
17. Peso do bebê:			
18. Uso de ATB antes da coleta da amostra: (1) Sim (2) Não			
19. Hemocultura positiva (1ª amostra): (1) Sim (2) Não ____/____/____		20. Hemocultura positiva (2ª amostra): (1) Sim (2) Não ____/____/____	
21. Microrganismo isolado:			
22. Drogas resistentes:			
23. Drogas sensíveis:			
24. Mecanismo de Resistência: (1) ESBL (2) KPC (3) NDM (4) MBL (5) MRSA (6) VRE			
25. Infecção ligada a dispositivo invasivo: (0) Não (1) Sim, qual: _____			
26. Infecção de origem: (1) Comunitária (2) Nosocomial			
27. Atendimento mãe: n.º			
28. Nome da mãe:			
29. Idade da mãe:		30. Pré natal: (0) Não (1) Sim, quantos?	
31. Idade gestacional:		32. Tipo de parto: (1) Normal (2) Cesária	
33. Mãe com Comorbidade: (0) Não (1) Sim, quais:			
34. Observações do RN ou mãe:			

Fonte: autora

ANEXO D – Comprovante de submissão do artigo I

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil

Manuscript ID

RBSMI-2018-0365

Title

INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEOPEDIÁTRICA: epidemiologia, microbiologia e fatores de risco maternos

Authors

Brixner, Betina
Bierhals, Nayanna
Oliveira, Caio
Renner, Jane

Date Submitted

25-Oct-2018

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

ANEXO E – Declaração de aceite e publicação da Revista Enfermagem Atual

Rio de Janeiro, 14 de Janeiro de 2019.

A **Revista Enfermagem Atual**, veículo oficial da Sociedade Brasileira de Enfermagem em Feridas e Estética (**SOBENFeE**), vem por meio deste documento declarar que, o artigo intitulado “**INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: estudo retrospectivo em um hospital de ensino**”, dos autores: Betina Brixner; Nayanna Dias Bierhals; Caio Fernando de Oliveira e Jane Dagmar Pollo Renner; foi aceite e será publicado na Edição 89, Revista n.º 26, correspondente aos meses de jan/fev/mar do ano de 2019.

Atenciosamente,

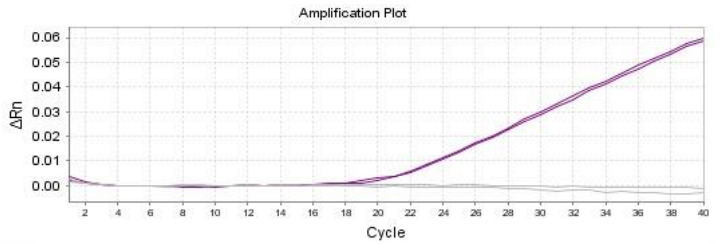
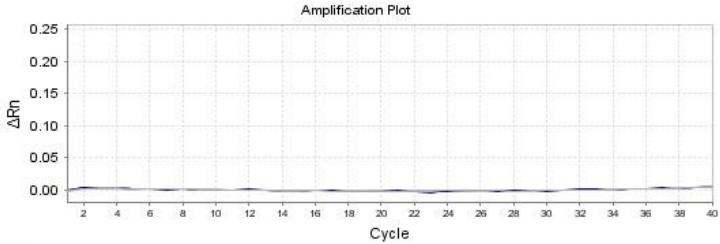
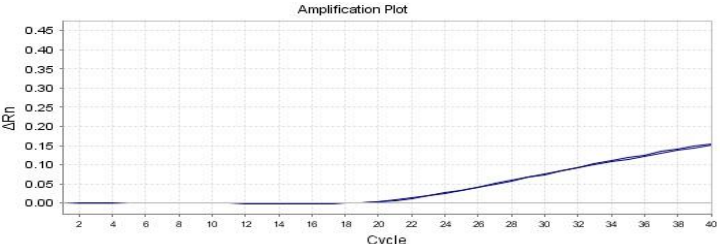
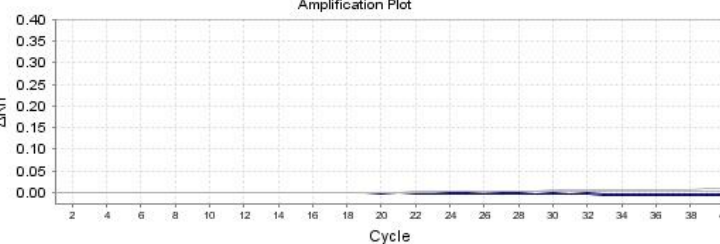
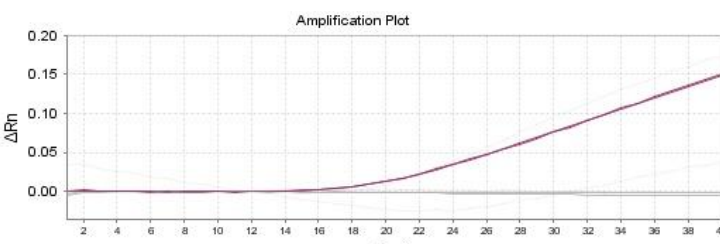
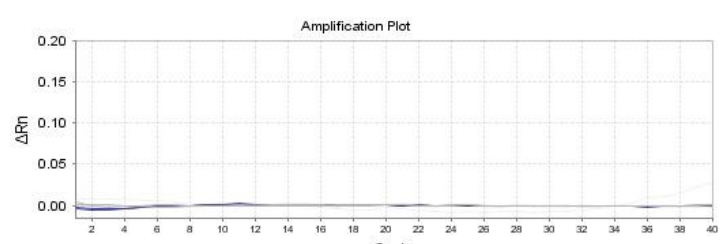


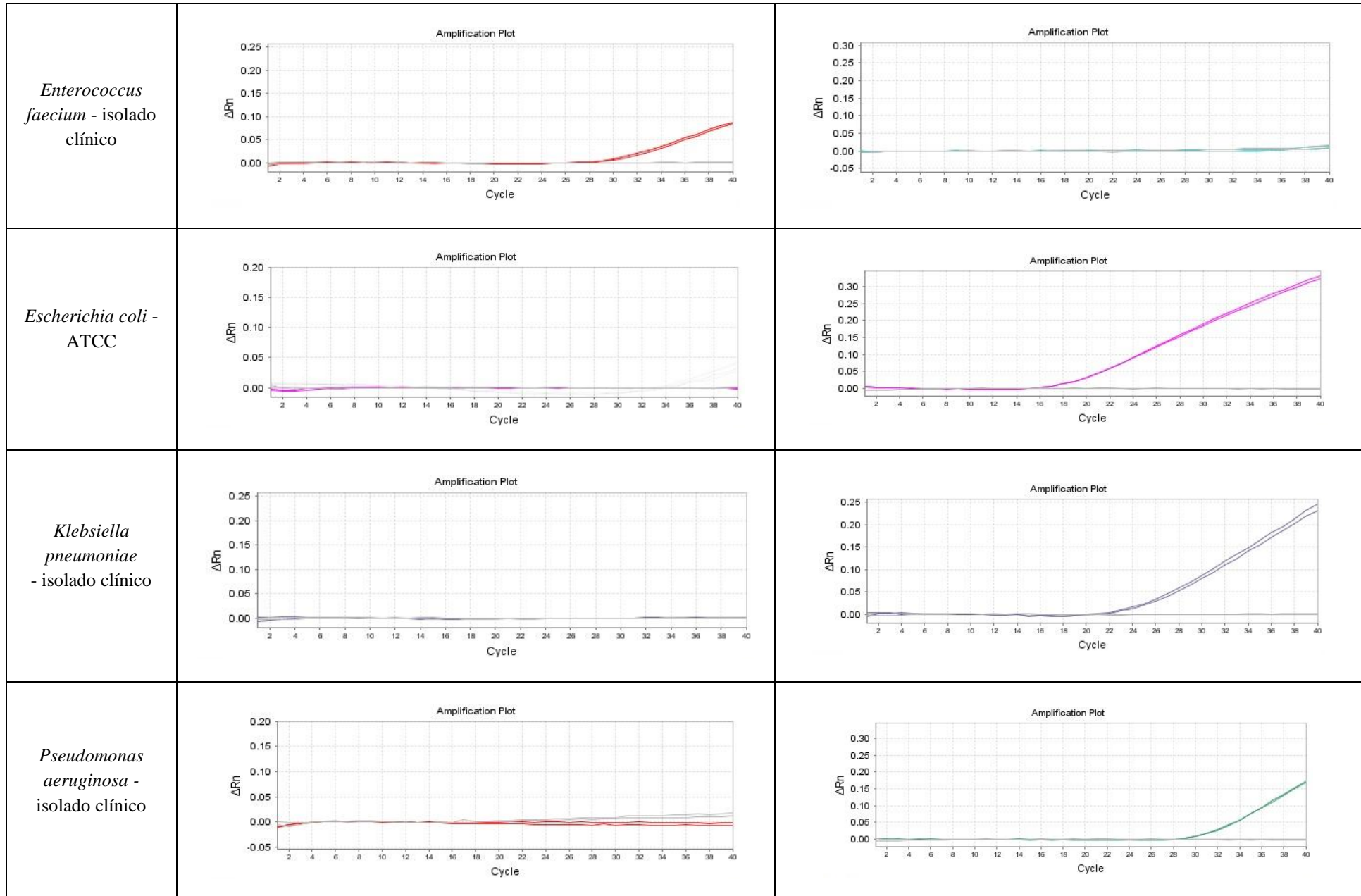
Prof.ª Enf.ª Caroliny dos Santos Guimarães da Fonseca

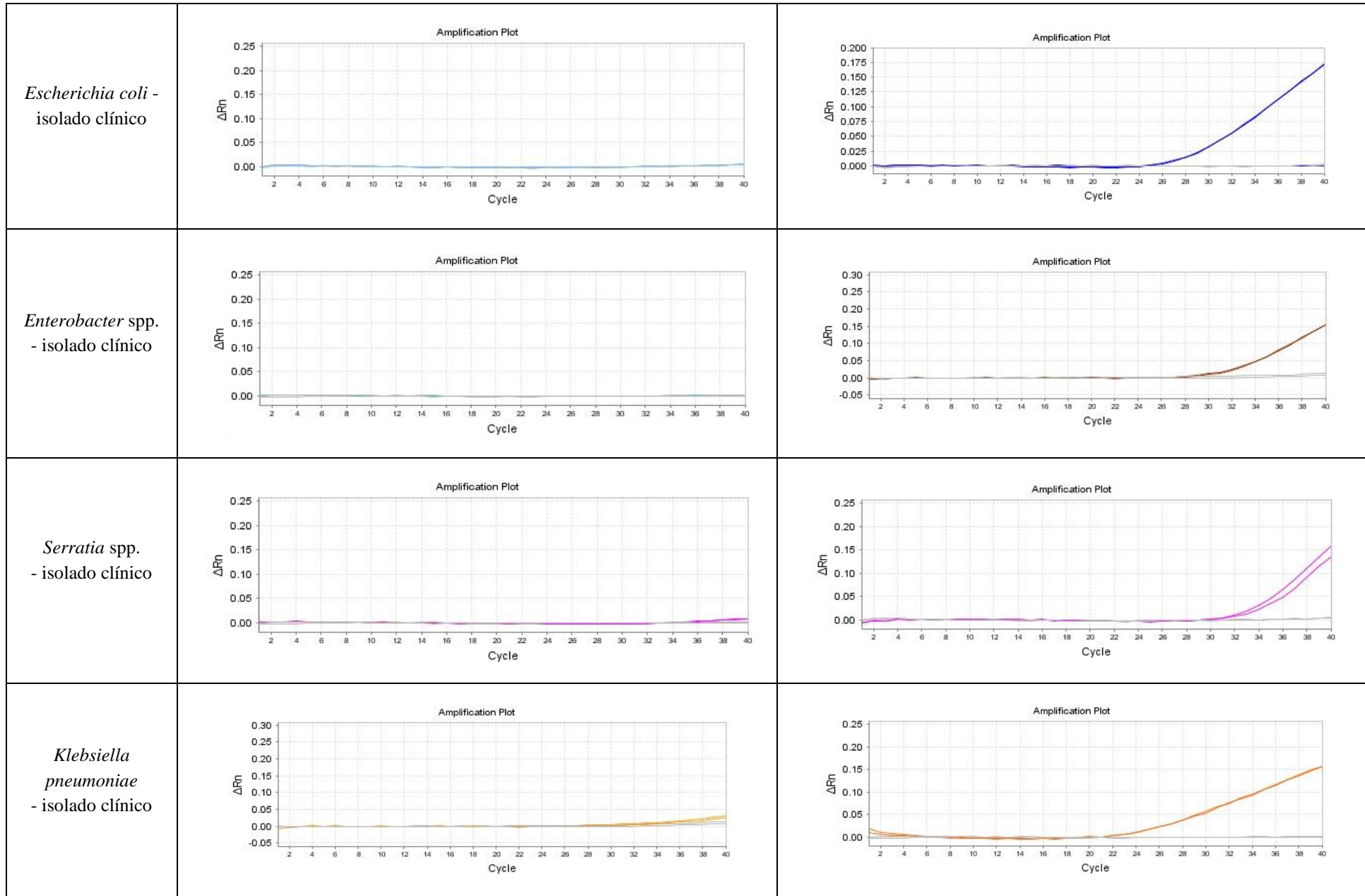
Editora-Chefe da Revista Enfermagem Atual

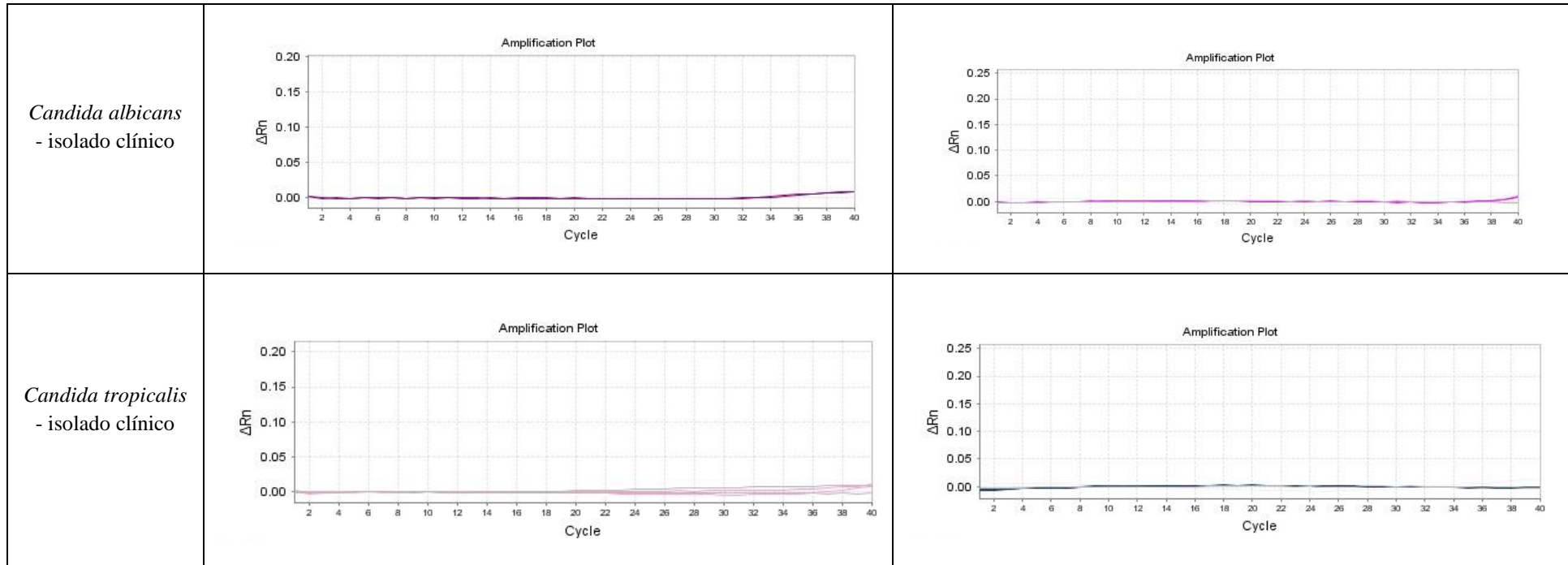
ANEXO F – Gráficos com as ampliações resultantes das padronizações do Artigo III

Resultados das análises da QPCR TaqMan Gram específica.

AMOSTRA	<i>PROBE^{FAM}</i> GRAM POSITIVA	<i>PROBE^{VIC}</i> GRAM NEGATIVA
<i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC		
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> – isolado clínico		
<i>Staphylococcus aureus</i> - isolado clínico		

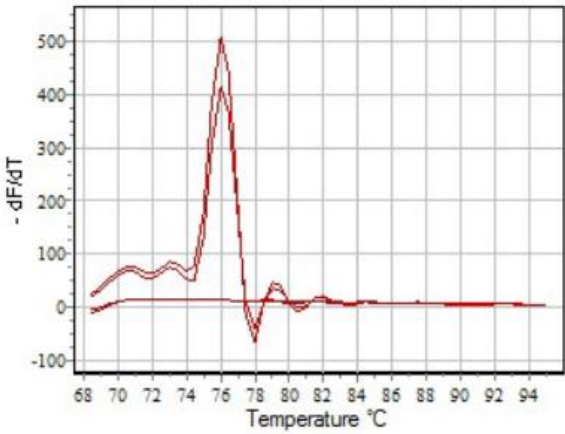
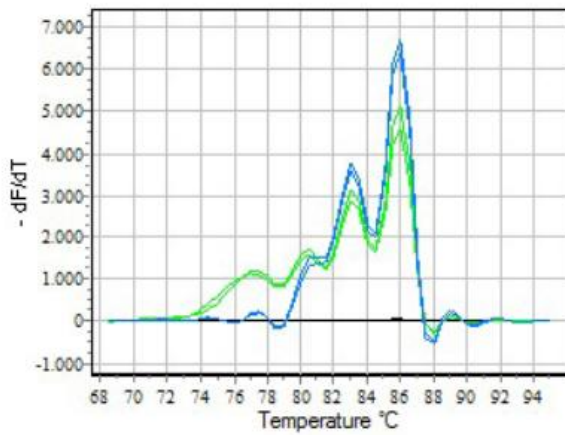
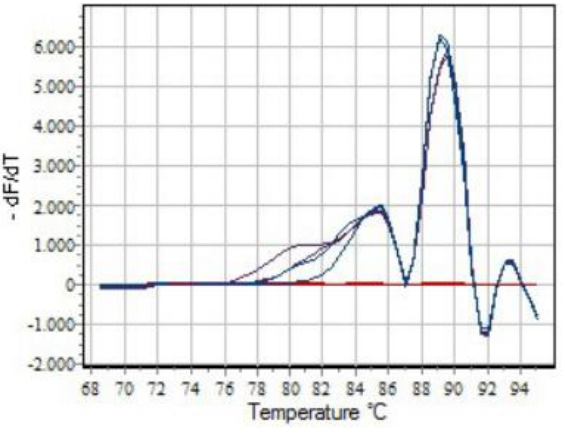


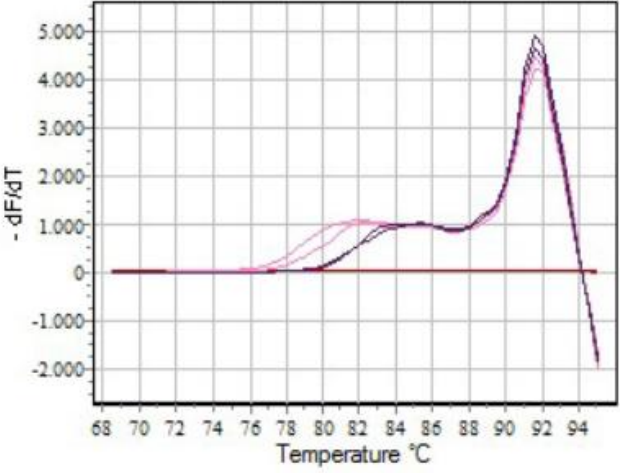
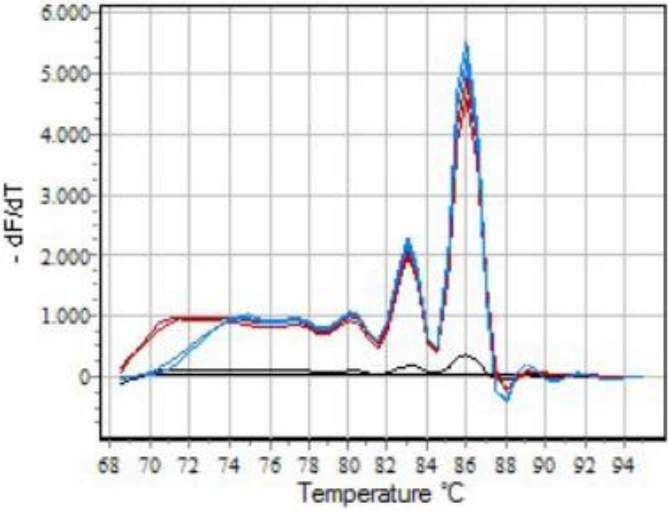
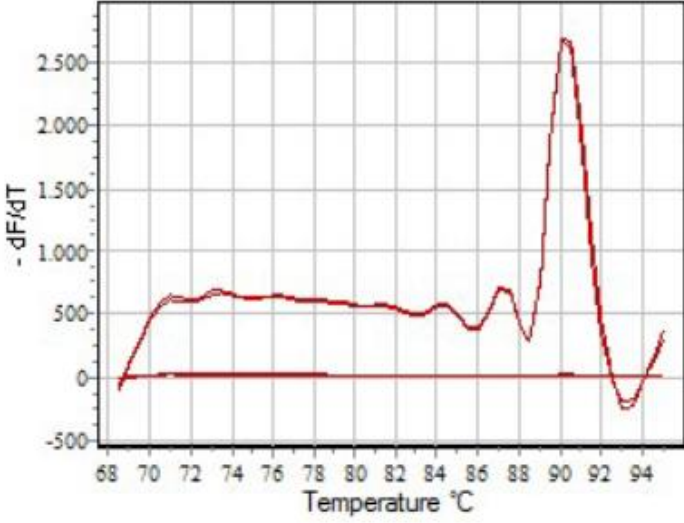




ANEXO G – Gráficos com as ampliações resultantes das padronizações do Artigo IV

Resultados das análises da QPCR Syber Green para detecção de genes de resistência.

GENE	CURVA/TEMPERATURA DE <i>melting</i> (°C)
<i>Bla_{mecA}</i>	 <p>The graph shows the melting curve for <i>Bla_{mecA}</i>. The y-axis represents $-dF/dT$ ranging from -100 to 500. The x-axis represents Temperature in °C, ranging from 68 to 94. A single, sharp peak is observed at approximately 76°C, reaching a maximum value of about 500. The baseline is relatively flat around 0.</p>
<i>Bla_{vanA}</i>	 <p>The graph shows the melting curve for <i>Bla_{vanA}</i>. The y-axis represents $-dF/dT$ ranging from -1.000 to 7.000. The x-axis represents Temperature in °C, ranging from 68 to 94. The curve shows multiple peaks: a small one at ~76°C, a larger one at ~84°C, and the highest peak at ~87°C reaching approximately 6.500. There is a small dip at ~88°C.</p>
<i>bla_{CTX-M}</i>	 <p>The graph shows the melting curve for <i>bla_{CTX-M}</i>. The y-axis represents $-dF/dT$ ranging from -2.000 to 6.000. The x-axis represents Temperature in °C, ranging from 68 to 94. The curve shows a primary peak at approximately 89°C reaching about 6.000. There is a secondary peak at ~84°C and a dip at ~92°C.</p>
<i>bla_{SHV}</i>	

	
<i>bla_{TEM}</i>	
<i>bla_{KPC}</i>	
<i>bla_{VIM}</i>	

