



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE - *campus Cuité*
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE BACTÉRIAS EM
AMBIENTE HOSPITALAR DO MUNICÍPIO DE CUITÉ - PB**

AMANDA GEOVANA PEREIRA DE ARAÚJO

**CUITÉ - PB
2022**

AMANDA GEOVANA PEREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE BACTÉRIAS EM
AMBIENTE HOSPITALAR DO MUNICÍPIO DE CUITÉ - PB**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos

**CUITÉ - PB
2022**

A663a Araújo, Amanda Geovana Pereira de.

Análise microbiológica de bactérias em ambiente hospitalar do município de Cuité - PB. / Amanda Geovana Pereira de Araújo. - Cuité, 2022. 52 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2022. "Orientação: Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima".

Referências.

1. Doenças infecciosas. 2. Ambiente hospitalar. 3. Bactéria - hospital. 4. Resistência bacteriana. 5. Hospital - controle - bactéria. 6. Ambiente hospitalar - Cuité - PB. 7. Hospital - análise - bactéria. 8. Análise microbiológica - bactéria. I. Lima, Igor Luiz Vieira de. II. Título.

CDU 616.9(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADEMICA DE SAUDE - CES
Sítio Olho D'água da Bica, - Bairro Zona Rural, Cuité/PB, CEP 58175-000
Telefone: (83) 3372-1900 - Email: uas.ces@setor.ufcg.edu.br

REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

ATA DA DEFESA PARA TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE FARMÁCIA,

REALIZADA EM 12 DE DEZEMBRO DE 2022

CANDIDATA: Amanda Geovana Pereira de Araújo.

BANCA EXAMINADORA: **Prof (ª). Dr (ª).** Igor Luiz Vieira de Lima Santos, UFCG, Orientador e Presidente da Banca, **Prof (ª). Dr (ª).** Maria Emília da Silva Menezes, Titular, UFCG, **Prof (ª). Dr (ª).** Maria da Glória Batista de Azevedo, Titular, UFCG.

TÍTULO DO TCC: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE BACTÉRIAS EM AMBIENTE HOSPITALAR DO MUNICÍPIO DE CUITÉ - PB. HORA DE INÍCIO: **10:00h**, LOCAL: **Sala Virtual do Google Meet**. Em sessão pública, após exposição de **25 minutos**, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da banca examinadora, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização, no tema do seu TCC, obtendo **nota 10,00**. Face à aprovação, declara o presidente da Banca, achar-se a examinada, legalmente habilitada a aprovação na disciplina de TCC, cabendo ao professor da disciplina de TCC encaminhar a anuência à PRE da Universidade Federal de Campina Grande, e, como de direito, providenciar o registro da nota e a sua consolidação no histórico individual da aluna. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é assinada por mim, **Prof (ª). Dr (ª).** Igor Luiz Vieira de Lima Santos e os membros da Banca Examinadora.

Cuité - PB, 12 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof (ª). Dr (ª). Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Orientador (a)

Prof (ª). Dr (ª). Maria Emília da Silva Menezes – (Titular/UFCG)

Prof (ª). Dr (ª). Maria da Glória Batista de Azevedo – (Titular/UFCG)

2 - APROVAÇÃO

2.1. Segue a presente Ata de Defesa de TCC da candidata Amanda Geovana Pereira de Araújo. Assinada eletronicamente pela Comissão Examinadora acima identificada.

2.2. No caso de examinadores externos que não possuam credenciamento de usuário externo ativo no SEI, para igual assinatura eletrônica, os examinadores internos signatários certificam que os examinadores externos acima identificados participaram da defesa de TCC e tomaram conhecimento do teor deste documento.

3- FICHA DE AVALIAÇÃO DO TCC

NOME DO ESTUDANTE: Amanda Geovana Pereira de Araújo, MATRÍCULA: 517220576

TÍTULO DO TRABALHO: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE BACTÉRIAS EM AMBIENTE HOSPITALAR DO MUNICÍPIO DE CUITÉ - PB

ITENS A SEREM AVALIADOS	PROFESSORES AVALIADORES		
	Prof (ª). Dr (ª). Igor Luiz Vieira de Lima Santos	Prof (ª). Dr (ª) Maria Emília da Silva Menezes	Prof (ª). Dr (ª). Maria da Glória Batista de Azevedo
NOTA DE 0,0 A 2,0			
Adequação as normas da ABNT:	2	2	2
Relevância do tema:	2	2	2
Diversidade da revisão bibliográfica:	2	2	2
Coerência entre objetivos e conclusão:	2	2	2
Qualidade textual:	2	2	2
Total:	10	10	10
DEFESA ORAL			
Obediência ao tempo cedido (25 +/- 5 min.):	2	2	2
Qualidade do material apresentado (slides):	2	2	2
Demonstração de domínio do tema:	2	2	2
Qualidade de comunicação oral:	2	2	2
Desempenho no questionamento da banca examinadora:	2	2	2
Total:	10	10	10

Média das avaliações do trabalho escrito e da apresentação:	10	10	10
Nota final:	10		
Data:	12/12/2022		



Documento assinado eletronicamente por **MARIA EMILIA DA SILVA MENEZES, PROFESSOR 3 GRAU**, em 21/12/2022, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIA DA GLORIA BATISTA DE AZEVEDO, FARMACEUTICO-HABILITACAO**, em 21/12/2022, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **IGOR LUIZ VIEIRA DE LIMA SANTOS, PROFESSOR 3 GRAU**, em 21/12/2022, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **3003487** e o código CRC **7BAB4426**.

Referência: Processo nº 23096.084101/2022-22

Dedico, primeiramente, a Deus por me sustentar até aqui e aos meus pais, Alexandra Pereira e Joaildo Marcos, por sempre acreditarem nos meus sonhos e lutarem por eles junto a mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que cuidou de tudo e abençoou minha caminhada, me deu forças, discernimento e sabedoria para lidar com as situações difíceis.

À toda minha família, em especial minha mãe: Alexandra Pereira Dutra, protagonista do meu sonho, que trabalhou duro durante tantos anos para ver sua única filha e primeira da família, formada. Gratidão pela sua vida, seu cuidado e amor por mim, costumo dizer que eu nada seria sem você. Nosso caminho até aqui foi muito árduo, mas a sua força de vontade e fé rompeu barreiras. Obrigada por nunca desistir de sonhar junto comigo. Ao meu pai, Joanildo Marcos Pereira de Araújo, meu orgulho, obrigada por todo suporte e amor para concretização deste sonho. Essa conquista também é sua!

À minha mãe Analzide Pereira (in memoria) que se foi muito cedo, deixando um grande vazio na nossa família. Tenho certeza que do céu, comemora comigo cada conquista. Às minhas tias Diana Pereira, Alexciane Pereira, Adneide Pereira, Joanice Araújo e ao meu tio Inácio Pereira minha eterna gratidão, o amor e zelo de vocês também ajudaram a construir a Amanda que sou hoje, cada um com seu jeito especial. Aos meus avós, José Elói Dutra e Maria de Lurdes Pereira de Araújo, gratidão por todo apoio e ensinamentos. Ao meu namorado, Vinícius Leite, que chegou no finalzinho do curso, mas que tem uma contribuição imensa. Obrigada pelo companheirismo e carinho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Igor Luiz, minha maior inspiração no mundo acadêmico, você sem sombra de dúvidas me ensinou muito, além da genética. Obrigada pela oportunidade de ingressar na iniciação científica ainda no segundo período do curso, e por me confiar 4 anos de pesquisa, aprendendo cada dia mais sobre o mundo fantástico da genética e tudo que ela proporciona. A professora Maria Emília Menezes e a mestre Maria da Glória Batista por aceitar fazer parte da banca examinadora e contribuírem para concretização deste trabalho. Gratidão aos demais professores do curso de Farmácia que colaboraram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo de pesquisa BASE (Biotecnologia Aplicada à Saúde e Educação), por todas as publicações e aprendizados, aos integrantes deste grupo, Maria Medeiros, Gabriela Leite, Silvânia, Tainá e demais, meu muito obrigada. Agradeço também aos amigos que Cuité me presenteou: João Manuel, Ana Beatriz, Kaline Cortêz, Sabrina Canzenza, Mykaella Joyce e Pablo Lucas. Vocês foram e são como uma família pra mim, cada um tem um lugar especial em meu coração.

A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar.

Carl Sagan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos locais selecionados para coleta das amostras dos ambientes hospitalares.....	17
Figura 2 - Lupa disposta em quadrantes utilizada para contagem direta das colônias de bactérias.....	18
Figura 3 - Cultivo microbiano de amostras ambientais do Hospital de Cuité.....	29
Figura 4 – Representação do método turbidimétrico em análise de Densidade Óptica.....	34
Figura 5 – Extração de DNA metagenômico dos ambientes avaliados.....	36
Figura 6 – Amplificação de DNA metagenômico utilizando o primer 16S.....	38
Figura 7 – Amplificações RAPD com linhagens aleatórias utilizando os primers H09 (linha A) e N15 (linha B).....	39
Figura 8 –Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina em placa de 96 poços nas concentrações [100 ug/mL], [200 ug/mL] e [500 ug/mL].....	41
Figura 9 - Amostras de bactérias resistentes a Ampicilina nas concentrações [10µg/mL], [50µg/mL], [100µg/mL] e [150 µg/mL], coletadas no sanitário do banheiro da maternidade.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Média dos valores das Unidades Formadoras de Colônias após 72 horas de incubação em meio de cultura LB para os seis ambientes avaliados..... 32
- Gráfico 2** - Contagem indireta das amostras utilizando método turbidimétrico com comprimento de onda de 600 nm..... 35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNAm – Ácido Desoxirribonucleico metagenômico
DNAg – Ácido Desoxirribonucleico genômico
rRNA – Ácido Ribonucleico ribossômico
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD– Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
UFCs – Unidades Formadoras de Colônias
MDRO – Organismos Multirresistentes
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio
OD – Densidade Óptica
UAS – Unidade Acadêmica de Saúde
UFPG – Universidade Federal de Campina Grande
ISBAf – Igor Santos Bactérias Forward
ISBAr – Igor Santos Bactérias Reverse
NCBI – National Center for Biotechnology Information
RDP-II – Projeto de Banco de Dados Ribossomal
HAI – Infecções associadas aos cuidados de saúde
DNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IPCS – Infecção de Corrente Sanguínea
IPC – Prevenção e Controle de Infecções
SARS-coV-2 – Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
INs – Infecções Nosocomiais
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARGs – Genes de Resistência aos Antibióticos
HGT – Transferência Gênica Horizontal
ANOVA – Análise de Variância
CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
SISGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
BASE – Biotecnologia Aplicada à Saúde e Educação
COVID-19 – Coronavírus

SWAB – Cotonete

LB – Luria Bertani

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

M. catarrhalis – *Moraxella catarrhalis*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

P. chrysogenum – *Penicillium chrysogenum*

K. pneumoniae – *Klebsiella Pneumoniae*

E. coli – *Escherichia coli*

A. baumannii – *Acinetobacter baumannii*

ssp – Subespécie

16S – Gene ribossômico 16

mgrB – Inibidor de PhoQ quinase

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

V – Volts

P1 – Ponto de coleta 1

P2 – Ponto de coleta 2

P3 – Ponto de coleta 3

P4 – Ponto de coleta 4

P5 – Ponto de coleta 5

P6 – Ponto de coleta 6

A1 – Amostra 1

A2 – Amostra 2

A3 – Amostra 3

A4 – Amostra 4

A5 – Amostra 5

A6 – Amostra 6

A7 – Amostra 7

A8 – Amostra 8

A9 – Amostra 9

A10 – Amostra 10

A11 – Amostra 11

A12 – Amostra 12

A13 – Amostra 13

A14 – Amostra 14

A15 – Amostra 15

A16 – Amostra 16

A17 – Amostra 17

A18 – Amostra 18

pmole – Picomolar

nmole – Nanomol

ng – Nanograma

mM – Megâmetro

ug/ml – Micrograma/mililitro

°C – Graus Celsius

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH 1N- Hidróxido de Sódio 1Normal

g- Grama

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

µl – Microlitro

UV – Ultravioleta

mA – Miliampère

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

CP – Controle Positivo

CN – Controle Negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Área de Estudo e Coletas	16
3.2 Contagem e Cultivo dos Microrganismos	17
3.3 Extração de DNA Metagenômico (DNAm)	18
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	18
3.5 Triagem da Atividade Antibacteriana da Ampicilina	20
3.6 Análise Estatística	20
3.7 Viabilidade	20
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1 Importância Bacteriana	21
4.2 Infecções Bacterianas Hospitalares	22
4.3 Identificação Bacteriana e Técnicas Moleculares Utilizadas	22
4.4 Resistência Antimicrobiana	24
4.5 Coinfecção Bacteriana em Período Pandêmico de COVID-19	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Cultivo dos Microrganismos	29
5.2 Contagem Microbiana	31
5.3 Extração de DNA Metagenômico (DNAm)	35
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
5.5 Triagem da Atividade Antibacteriana da Ampicilina	40
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	

RESUMO

Um dos desafios encontrados em todo o mundo é o aumento dos tipos de resistências antimicrobianas, tendo em vista que as bactérias estão por toda parte e quando patogênicas desenvolvem infecções no hospedeiro humano. Em ambientes hospitalares causam repercussões irreversíveis, algumas vezes, incontroláveis pelos órgãos de saúde. Dessa forma, a pesquisa objetivou realizar uma análise observacional de microrganismos bacterianos em seis ambientes hospitalares no município de Cuité/Paraíba, desenvolvendo estudo populacional molecular das bactérias e triagem antimicrobiana. Metodologicamente, as amostras em triplicatas foram coletadas em pontos estratégicos do Hospital, posteriormente foi realizado o cultivo microbiano, contagem e isolamento de linhagens, bem como triagem antibacteriana em diferentes concentrações de Ampicilina. Para análise das amostras, foram realizadas técnicas como: extração de DNA, Reação em cadeia da Polimerase utilizando marcadores de RAPD – Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico - e o gene ribossômico 16S. Os resultados obtidos evidenciaram alto grau de contaminação das superfícies avaliadas, levando em consideração o número elevado de colônias por placa e a variabilidade fenotípica das amostras, fato que demonstra a grande necessidade de biomonitoramento e limpeza adequada dos locais. A triagem antibacteriana com ampicilina apresentou resistência significativa, e as técnicas moleculares, como as análises dos perfis de RAPD nos isolados bacterianos se mostraram promissoras. Em síntese, é importante a preocupação com a higiene dos ambientes e corpo clínico no âmbito hospitalar, principalmente, em áreas de alto contato para auxiliar no controle de bactérias patogênicas e possíveis infecções futuras. A compreensão da população microbiana presente nestes locais é de grande importância científica, social e econômica, pois auxilia na tomada de decisões e soluções pelo poder público.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias; Resistência; Ambiente hospitalar.

ABSTRACT

One of the challenges encountered all over the world is the increase in the types of antimicrobial resistance, given that bacteria are everywhere and when pathogens infect infections in the human host. In hospital environments, they cause irreversible repercussions, sometimes uncontrollable by health agencies. The research aims to perform an analysis of hospital microorganisms in hospital settings without bacteria screening, eliminating multicultural, population screening, molecular and microbial bacterial screening. Methodologically, as triplicate samples were collected at strategic points of the Hospital, later the cultivation of strains, counting and isolation of strains, as well as antibacterial screening in different results of Ampicillin. For sample analysis, techniques such as: DNA collection, Polymerase Chain Reaction, Random Polymorphic DNA RAPD markers - and the 16S ribosomal gene were performed. The results obtained with the degree of importance, the degree of cleanliness and the identification of suitable characteristics, taking into account the high number of colonies and the variability that demonstrates the great need for cleaning of local communities Antibacterial screening with ampicillin showed significance, and as molecular techniques, as the evaluations of studies of RAPD bacterial isolates if promissory. In summary, it is important to be concerned with the hygiene of environments and clinical staff in the hospital environment, especially in areas of high contact, to assist in the control of pathogenic bacteria and possible future infections. The understanding of the microbial population present in these places is of great scientific, social and economic importance, as it helps in decision-making and solutions by the government.

KEY WORDS: Bacteria; Resistance; Hospital environment.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a resistência antimicrobiana tem se tornado uma ameaça à saúde humana, afetando negativamente a qualidade de vida de pacientes hospitalizados, com organismos multirresistentes (MDROs), podendo ser adquiridos diretamente de outros pacientes hospitalares ou indiretamente do ambiente hospitalar, seja de equipamentos, sondas, ou até mesmo de procedimentos. Esses microrganismos são considerados um receptáculo de genes de resistência antimicrobiana com os mais diferentes princípios e habilidades de sobrevivência em condições extremas ou assépticas (MOREIRA *et al.*, 2020). Além disso, as bactérias adotam estratégias moleculares, persistindo cada vez mais a diversas classes de antibióticos clinicamente utilizáveis (SZE; SCHLOSS, 2019).

A formação de biofilme é um dos fatores de virulência mais importante de bactérias patogênicas, pois permitem que estas escapem do mecanismo de defesa do hospedeiro. Nesta perspectiva, as bactérias no biofilme são 1000 vezes mais resistentes devido à lenta penetração dos medicamentos e ao microambiente alterado (LÉPEŠOVÁ *et al.*, 2020). Assim, a exposição humana a patógenos resistentes ocorre no contexto de ecossistemas microbianos, e o âmbito hospitalar pode ser uma fonte para uma série de outros microrganismos patogênicos oportunistas (DALTON *et al.*, 2020).

As infecções associadas aos cuidados de saúde (HAIs) favorecem internações hospitalares prolongadas, aumento da mortalidade bem como elevados custos. De modo geral, o paciente internado está sujeito a diversas terapias medicamentosas que afetam o sistema imune e o torna susceptível a adquirir infecção hospitalar, exemplificada pelo caráter oportunista das bactérias afetando hospedeiros que já estão imunossuprimidos, como exemplo disso são as infecções secundárias em pacientes com COVID-19 que estão internados em unidades de terapia intensiva, e a todo momento vulneráveis a adquirir uma infecção bacteriana. Além disso, há fatores que favorecem essas infecções, como a transmissão de microrganismos por superfícies, pias, bebedouros, leitos e mãos de profissionais contaminados, podendo desencadear maiores surtos de HAIs (KOCH, 2015; BOADA *et al.*, 2018; ASMARAWATI *et al.*, 2021).

Pesquisas realizadas no início da pandemia relataram que as infecções bacterianas foram detectadas em 19,7% dos pacientes com COVID-19 internados em unidades de alta e de terapia intensiva, predominando as infecções secundárias. Nesse contexto, a coinfeção bacteriana em pacientes hospitalizados é considerada fator de risco crítico para

a gravidade de seu quadro clínico. Circunstâncias como estas dificultam ainda mais um diagnóstico, tratamento e prognóstico precisos (SINGH *et al.*, 2021; ASMARAWATI *et al.*, 2021).

As cepas bacterianas responsáveis pela maioria das infecções neonatais invasivas são frequentemente resistentes aos antibióticos usados atualmente, e muitos são resistentes a antibióticos de várias classes diferentes, incluindo novos medicamentos do mercado, o que complica e limita as possibilidades de uma terapia satisfatória (TUMUHAMYE *et al.*, 2021). 20 a 30% dos pacientes hospitalizados recebem tratamento com antibióticos durante a hospitalização, isso permite boas conjunturas para o desenvolvimento de resistência devido à sua alta pressão seletiva (LÉPESOVÁ *et al.*, 2020).

Sendo assim, cerca de 1% das bactérias que são encontradas em determinado ambiente representam parte dos filos bacterianos conhecidos, isso significa dizer que existe uma vasta gama oculta de diversidade que nunca foi vista antes (LAGIER *et al.*, 2015). Fundamentado nisso, ambientes hospitalares começaram a ser investigados com tecnologias de biologia molecular, na tentativa de caracterizar a composição daquele local, pois ainda que os organismos multiresistentes (MDROs) possam ser detectados por métodos microbiológicos de diagnóstico de rotina, esses métodos são escassos para identificar as cadeias de transmissão, tendo em vista que várias cepas de cada MDRO podem estar circulando no hospital e na comunidade (PARCELL *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o trabalho realizou uma análise microbiológica das populações presentes do âmbito hospitalar em estudo. Pesquisas dessa natureza possibilitam a aquisição de informações prévias importantes para as agências de vigilância, permitindo entender sobre o aparecimento de microrganismos resistentes ou até mesmo monitorá-los. O estudo também auxilia no engrandecimento não só do meio acadêmico, mas também da sociedade local de modo geral que terá informações dos departamentos hospitalares a respeito do quantitativo de bactérias, e qual deles merecem maior atenção na assepsia e higienização antes de realizar qualquer procedimento, respaldando ainda mais sobre o cuidado e a precaução que se deve ter em ambientes com grande fluxo de pessoas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma análise observacional de microrganismos bacterianos em ambiente hospitalar no município de Cuité, Paraíba.

2.2 Objetivos específicos

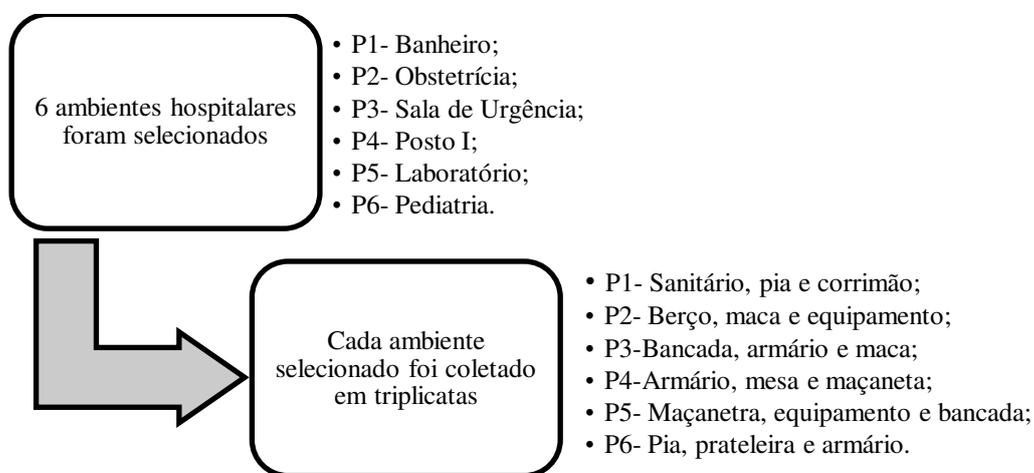
- Desenvolver um estudo populacional molecular das bactérias presentes em ambientes hospitalares;
- Realizar contagem direta e indireta dos microrganismos para os locais analisados;
- Aplicar técnicas baseadas ou não em cultivo microbiano nessa população global de microrganismos;
- Avaliar atividade antimicrobiana do antibiótico Ampicilina frente aos locais coletados com elevados índices de contaminação.

3 METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo e Coletas

O estudo foi realizado no Hospital e Maternidade Nossa Senhora das Mercês, situado em Cuité, Paraíba, em período pandêmico, de 2020 a 2021, contemplando a vigência do projeto de iniciação científica proposto. Dessa forma, em cada departamento foram selecionadas áreas de alto contato pelos pacientes e corpo clínico, incluindo itens e superfícies, como obstetrícia, pediatria, salas, postos de urgência, laboratórios e banheiros. As coletas foram realizadas em triplicatas com auxílio de SWABs e os locais foram nomeados de P1 a P6, onde cada um deles refere-se a um ambiente composto por subáreas. Sendo assim, os ambientes P1 e P2 são de setores próximos e foram coletadas amostras no banheiro maternidade (sanitário, pia, barra de segurar) e obstetrícia (berço, maca, equipamento), respectivamente. Os ambientes P3, P4 e P5 foram coletados na sala de urgência (bancada, armário, maca), no posto I (armário de medicação, mesa, maçaneta) e no laboratório (maçaneta, equipamento, bancada). Enquanto o P6 está em uma área mais afastada e foi coletada no setor de pediatria (pia, prateleira e armário), como mostra a figura 1. Todas as coletas realizadas foram respaldadas por acordo mútuo entre os pesquisadores e os representantes das instituições envolvidas tomando todas as precauções principalmente em tempos de pandemia.

Figura 1- Distribuição dos locais selecionados para coleta das amostras dos ambientes hospitalares.

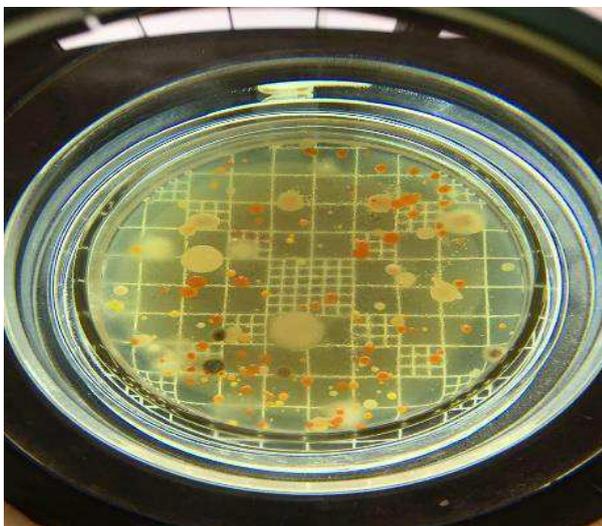


Fonte: Própria autora, 2021.

3.2 Contagem e Cultivo dos Microrganismos

As bactérias obtiveram crescimento esperado em razão do meio de cultura rico em nutrientes que favoreceu o seu desenvolvimento. O meio LB (Luria Bertani) é composto de 10g de Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 10g NaCl e 1mL de NaOH 1N, quando sólido foi utilizado 40g de Ágar Bacteriológico para 1L de água destilada autoclavada. Posteriormente, as colônias de bactérias foram contadas, com a contribuição de uma lupa dispostas em quadrantes, facilitando esse processo, como mostra a figura 2. Algumas amostras passaram por diluição seriada, objetivando diminuir a quantidade de colônias presentes por placas, com isso foi determinado o fator de diluição que em seguida foi multiplicado pela quantidade de colônias existentes. O método de diluição simplificou a contagem, tornando-a mais acertada e precisa.

Figura 2 - Lupa disposta em quadrantes utilizada para contagem direta das colônias de bactérias.



Fonte: Própria autora, 2021.

Os cálculos necessários foram realizados para obter o valor final das unidades formadoras de colônias (UFCs). Para a contagem das células viáveis nesse ambiente foram utilizados métodos dependentes de cultivo. O método utilizado para contagem indireta foi a turbidimetria, que tem por objetivo avaliar a massa total de uma população de microrganismos presentes em um determinado meio líquido, para que assim seja possível estimar sua concentração celular, ou seja, é um procedimento através do qual se pode medir a absorbância do meio em um espectrofotômetro, verificando-se que a turvação está relacionada com a massa de microrganismos presente.

Comprimentos de onda frequentemente usados para medição da Densidade Óptica de suspensões de células de bactérias ou leveduras incluem 540, 600 ou 640 nm uma vez que há poucas substâncias que podem estar presentes em solução que absorvem nesse comprimento de onda que poderiam ser interferentes.

Seguidamente, os microrganismos foram isolados diante das suas características morfológicas para testes moleculares. Esses isolados foram cultivados novamente em *ependorff* contendo 1,5 mL do meio LB líquido, onde cada um deles cresceu por três dias, o que favoreceu um aumento de células e DNA dos microrganismos, facilitando, assim, a extração do material genético.

3.3 Extração de DNA Metagenômico (DNAm)

O DNA metagenômico foi extraído dos seis ambientes e suas respectivas subáreas, totalizando dezoito extrações. O procedimento de extração de DNA total foi realizado pelo método Brometo de Cetil-Trimetil- Amônio (CTAB) descrito por Doyle e Schoeni (1987).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nas reações de PCR foram utilizados os primers 16S construídos (ISBA) bem como os RAPD (H-09 e N-15) já descritos por Santos *et al.*, 2010. Após a confirmação *in vitro* da eficiência dos primers desenvolvidos estes foram aplicados em larga escala nas amostras analisadas.

As Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas no termociclador BIOER *Life touch* (*Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.*) contendo as seguintes concentrações 2,5mM de MgCl₂, 10nmole de DNTPs, 40ng de DNA molde, 40pmole de cada *Primer*, 2Un de Taq DNA Polimerase (*Ludwig Biotech*) e 2µl de Tampão de Enzima 10x, para um volume final de 20µl. O programa utilizado para as amplificações dos DNAs foi nomeado de RAPD rápido que consistiu em ciclos sucessivos de: desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 30s, e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1,5% durante 1 hora a 80V e 80mA, corados com corante *sybr gold*, submetidos ao transiluminador de UV e fotodocumentados com o equipamento L-PIX.

3.5 Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina

O teste antimicrobiano com ampicilina foi realizado em microplacas dispostas de 96 poços fundo V, estéreis e resistentes a temperatura entre -10°C e 70°C . Para cada amostra, utilizou-se diferentes concentrações de 100ug/mL, 200ug/mL e 500ug/mL do antibiótico, além disso, foram realizados controles negativos (contendo meio de cultura) e controles positivos (contendo meio de cultura juntamente com inóculo). O meio LB líquido foi inoculado com colônias bacterianas, que foram, posteriormente, incubadas a 37°C por 24 horas. As suspensões bacterianas foram padronizadas com 10 μl para cada teste, onde o inóculo foi diluído para uma concentração final de 250 μl de meio por poço. A avaliação da atividade antimicrobiana da ampicilina foi examinada através da visualização da turvação da cultura, sendo utilizada como uma indicação do crescimento bacteriano. Da mesma forma que a inibição do crescimento foi definida pela redução da turbidez da cultura. Além disso, também foi utilizada a triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina em placas de petri. O meio de cultivo foi acrescido com o antibiótico de estudo em concentrações distintas: 10ug/mL, 50ug/mL, 100ug/mL, 150ug/mL, utilizadas na amostra do sanitário do banheiro da maternidade, uma vez que esta apresentou um maior grau de multiplicidade bacteriológica.

3.6 Análise Estatística

Todos os testes estatísticos de médias, desvios padrão e coeficientes de correlação e regressão lineares utilizados para o comparativo entre as triplicatas dos dados analisados e sua relevância foi dada pela ANOVA utilizando o teste preciso de Fisher a um ($p \leq 0,05$) para ser considerado como significativo com um grau de confiabilidade do experimento de 95% na contagem dos microrganismos. Adicionalmente o teste t de student servirá como teste paramétrico servindo para comparação entre os diferentes compostos independentes analisados assumindo que o experimento possua uma distribuição normal.

3.7 Viabilidade

Este trabalho prospectivo está em acordo com a Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015 e segue as normas do CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Dito isto, a presente pesquisa cumpre todos os requisitos estabelecidos pela referida lei, bem como

já está cadastrada no acesso ao patrimônio genético do SISGen e não realiza suas amostragens em humanos, apenas no ambiente hospitalar.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Importância Bacteriana

A atuação das bactérias também merece destaque, elas são essenciais para a vida na terra, podendo ser encontrada em qualquer lugar, como a pele, as mucosas e recobrimdo o trato intestinal dos homens e dos animais, no ar, no solo (SANTOS, 2004). Em sua imensa maioria passam despercebidos a olho nu, mas podem ser caracterizadas através de equipamentos e técnicas moleculares. Algumas são consideradas comensais, residem no organismo e não trazem prejuízo a este, pelo contrário, protegem contra a colonização de bactérias consideradas patogênicas, por competir com estas por espaço e alimento. São identificadas cientificamente desde a invenção do microscópio. Com um curto tempo de reprodução, 30 a 40 minutos, as bactérias possuem a capacidade de responder de maneira rápida as mudanças e condições ambientais. Sendo assim, já existe um interesse em enzimas isoladas de bactérias termofílicas, nas quais as reações podem ser realizadas a taxas mais altas devido às temperaturas elevadas em que estas suportam (HERMANN, 2003).

Ademais, as bactérias também estão interligadas na fabricação de vários produtos, bem como a aplicação das reações anaeróbias da fermentação do açúcar e a conversão do leite. Da mesma forma, a produção de etanol por leveduras é explorada pela indústria cervejeira há milhares de anos e é usada na produção de combustíveis. Além dessas aplicações, uma das mais relevantes é a que diz respeito aos estudos para desenvolvimento e otimização de antibióticos, um exemplo precípuo é a penicilina (GUIMARAES; MOMESSO; PUPO, 2010; PEREIRA; PITA, 2018).

Inesperadamente, em 1928 era descoberta a primeira penicilina pelo médico e bacteriologista Alexander Fleming, que observando uma colônia de *S. aureus* havia uma contaminação com o fungo *Penicillium notatum* e em volta deste percebia um halo em que a bactéria não se desenvolveu. Com isso, após vários testes com a cultura isolada desse fungo, ele concluiu que provavelmente estava sendo produzida uma substância que eliminava as bactérias, denominando-a como penicilina (NICOLAOU *et al.*, 2017).

Alguns autores desacreditam que o gênero *Staphylococcus* coagulase-positivo, como *S. aureus*, faça parte das bactérias comensais da pele, em razão destas acarretar infecções importantes e graves como bacteremia, pneumonia, endocardite e síndrome do choque tóxico, como infecções de caráter oportunista. Muito embora, bactérias como,

Staphylococcus epidermidis e outros estafilococos coagulase negativos colonizam a microbiota humana residente (PEACOCK; PATERSON, 2015; WILLIAMS; GALLO, 2015; PRESCOTT *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018).

4.2 Infecções bacterianas hospitalares

Aproximadamente 70% das infecções nosocomiais (INs), isto é, infecções adquiridas nos hospitais, estão associadas as bactérias patogênicas (AGABA *et al.*, 2017). As INs se desenvolvem pelo menos 48-72 h após a admissão, sendo mais frequentes em setores de terapia intensiva onde os surtos geralmente se originam (ASENSIO *et al.*, 2000). Esses setores são destinados aos pacientes em situações graves, que necessitam de monitoramento contínuo de suas funções vitais básicas. Em contrapartida, são setores que exigem uma atenção minuciosa, tanto pela instabilidade funcional dos pacientes quanto pelo risco elevado destes adquirirem infecções (PEREIRA *et al.*, 2016; SOUSA; OLIVEIRA; MOURA, 2016).

Doenças crônicas degenerativas, uso incorreto dos antimicrobianos, idade do paciente, procedimentos invasivos também são fatores que contribuem para as infecções bacterianas nosocomiais e primárias (SANTOS *et al.*, 2014). A *Klebsiella pneumoniae* é o agente etiológico mais prevalente em infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes adultos das unidades de terapia intensiva (UTI) (ARAÚJO, 2017). Essa bactéria também pode ser encontrada na orofaringe de pessoas saudáveis (KONEMAN; ALLEN, 2008).

Com o passar do tempo, as infecções adquiridas em unidades hospitalares e ambulatoriais foram sendo considerado um dos problemas de saúde mais recorrente mundialmente (WHO, 2016). Três principais gêneros estão envolvidos nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), são as Gram-negativas: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Escherichia*. Ademais, vale destacar também as Gram-positivas, enfatizando os gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* (ARAÚJO *et al.*, 2018).

4.3 Identificação bacteriana e técnicas moleculares utilizadas

O fato de as bactérias passarem despercebidas a olho nu, favorece sua camuflagem nos ambientes tornando-se imprescindível seu monitoramento e caracterização. Assim, muitos são os investimentos em pesquisas que desenvolvam estratégias e produtos capazes

de combater esses microrganismos no tratamento de infecções, sem gerar maiores prejuízos a saúde pública (KOCHINSKI; BARBOSA; ROMANELLO, 2020). Estudos relacionados as bactérias tem sido indispensáveis para o melhor entendimento da sua fisiologia e morfologia, mecanismos patogênicos, características antigênicas e identificação de espécies, além de se mostrar uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças e na prevenção de infecções (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

À vista disso, a microbiologia utiliza métodos dependentes de cultura, uma vez que o grande predomínio dos patógenos humanos conceituados são de fácil cultivo e podem estar presentes em quantidades baixas para serem detectados sem enriquecimento seletivo. Abordagens dependentes de cultura, no entanto, se concentram principalmente na identificação de microrganismos, objetivando resultados que provavelmente subestimarão a verdadeira diversidade microbiológica quando considera toda a população bacteriana do ambiente (LAX *et al.*, 2017). Todavia, as pesquisas não devem se basear apenas nos dados obtidos por esse método, mas também procurar integralizar entre esses dados e os obtidos por metodologias independentes de cultivo (HOVER *et al.*, 2018).

Com as técnicas metagenômicas, ou melhor, com análise genômica da população de microrganismos de um determinado ambiente, a investigação da biodiversidade tem evitado a grande contagem de placas e vieses das reações de PCR (VERA-GARGALLO; VENTOSA, 2018). Sequências de DNA genômico (DNAg) e DNA metagenômico (DNAm) provenientes de populações bacterianas nativas presentes em diversos ambientes podem ser amplificadas pelo uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), seja amplificando um fragmento genético em uma única ou múltiplas cópias. A amplificação de um pedaço do DNA, geralmente é realizada em situações em que a quantidade de material genético para estudos é pequena, como na genética forense, ou na detecção de microrganismos infecciosos (POPOWSKA *et al.*, 2012).

O RAPD (Polimorfismos no DNA Amplificados Aleatoriamente), assim como tipagem baseados em rRNA 16S são técnicas empregadas na identificação de diferentes organismos seja para caracterização ou para estudos prévios. É uma tendência no uso de *primers* RAPD que eles sejam curtos e que tenham temperaturas de *melting* baixas para favorecer a amplificação aleatória das sequências inespecíficas randômicas em reações de PCR nos organismos estudados. Apesar da técnica de RAPD ter um marcador molecular dominante, ou seja, não distinguir heterozigotos de homozigotos (MEDRAOUI *et al.*, 2007), dependendo do objetivo que se pretende alcançar, muitas informações importantes podem ser obtidas para selecionar material genético de interesse (SANTOS *et al.*, 2010).

Para compreender sobre a função de uma comunidade bacteriana é necessária uma descrição criteriosa do ecossistema microbiano por métodos e técnicas de biologia molecular (HOU *et al.*, 2015). Por exemplo, o sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rRNA fornecem informações sobre a filogenia dos microrganismos, assim juntamente com a bioinformática, as análises filogenéticas são vistas como as mais promissoras ferramentas nos estudos visando à caracterização das comunidades microbianas e como elas estão se comportando em diferentes condições ambientais, ou seja, identificando os isolados com base no princípio da semelhança de sequências com outros genomas de referências que já foram descritos antes (JAKA *et al.*, 2018).

Posto isso, técnicas de biologia molecular estão se tornando cada vez mais comuns na pesquisa microbiológica, pelo fato de transparecer propriedades desconhecidas e insuspeitas sobre doenças infecciosas bacterianas e por conseguinte, reduzir potencialmente a morbimortalidade dos pacientes em ambientes hospitalares (ROACH *et al.*, 2015).

4.4 Resistência antimicrobiana

A crise de resistência aos antibióticos redirecionou a atenção para a prevenção e controle de infecções em hospitais. Devido a essa crise, estima-se que até 2050 o mundo sofrerá impactos econômicos de \$100 trilhões e milhões de mortes por todo o mundo. O ambiente hospitalar é um ponto importante da rede de propagação, com evidências crescentes de que abriga patógenos resistentes a antibióticos (CHNG *et al.*, 2020). Além disso, a variabilidade genética bacteriana também varia entre os diferentes departamentos do hospital como os corredores, salas de estar, quartos de pacientes e banheiros (DALTON *et al.*, 2020).

A resistência aos antimicrobianos é uma epidemia global crescente na medicina clínica. E é sabido o esforço para desenvolver novos antibióticos ou modificar os existentes para combater patógenos resistentes no mundo. Porém, essa persistência dá saltos evolutivos uma vez que a bactéria pode escapar do efeito dos antibióticos por diferentes mecanismos, como neutralizar os antibióticos, bombeá-los para fora da célula ou modificar sua estrutura externa, resultando na inibição da ligação dos medicamentos às bactérias (BREIJYEH *et al.*, 2020).

Para Wu *et al.* (2018) há três caminhos para a resistência dos organismos. Primeiro, a liberação de antibióticos na dose de sub inibição resultante de atividades antrópicas

exercendo uma pressão seletiva de longa duração sobre a comunidade microbiana. Em segundo lugar, bactérias resistentes podem continuar proliferando, disseminando e persistindo no meio ambiente. Em terceiro lugar, o transporte de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) entre bactérias de diferentes espécies via transferência gênica horizontal (HGT), na qual os genes de resistência são adquiridos a partir de constituintes genéticos móveis (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2016; NODARI; BARTH, 2016).

A resistência aos antibióticos classifica-se como natural ou intrínseca e adquirida. A natural provém do processo de evolução da bactéria; como exemplo tem-se as bactérias que não possuem parede celular, fazendo com que os fármacos que atuam interferindo na síntese da parede bacteriana, não tenham efeito positivo (HABBOUSH; GUZMAN, 2020). A resistência adquirida ocorre por transmissão horizontal de genes. Alguns componentes bacterianos que possuem a capacidade de resistir são: plasmídeos, transposons, integrons e outros genes provenientes de outras células bacterianas (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares e destacam-se por conseguir se duplicar independente do DNA cromossômico; outrossim, ainda existem plasmídeos de virulência que acentuam a capacidade da bactéria de causar doenças (VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016).

Frente a necessidade e dificuldade em selecionar um antibiótico sensível, o uso de combinações tornou-se uma prática comum na medicina. Em contrapartida, as associações de antimicrobianos podem produzir efeitos diversos, variando desde efeitos sinérgicos desejáveis até efeitos antagônicos em que um antibiótico interfere negativamente na ação do outro (ULRICH-MERZENICH, 2014). Diante disso, estudos demonstram que as penicilinas (amoxicilina, ticarcilina, ampicilina e piperacilina) quando isoladas, possuem atividade para poucas cepas da bactéria em estudo. Entretanto, quando associadas aos inibidores da β -lactamase, como o tazobactam, sulbactam e clavulanato, apresentam uma ampla atividade contra cepas de *S. aureus* e outras bactérias anaeróbias e gram-negativas (RAYNER; MUNCKHOF, 2005; BRASIL, 2007).

Recentemente, estudos de testes com antimicrobianos em cepas bacterianas dos anos de 2018, 2019 e 2020 demonstraram aumento na porcentagem de isolados resistentes, elevando em 28% norfloxacin, 19% oxacilina, 17% clindamicina, 16% imipenem, 13% eritromicina, 12% meropenem, 12% cefuroxima, 11% gentamicina, 8% ciprofloxacina, 8% trimetoprim/sulfametoxazol, 5% cefepima, 3% amoxicilina/ácido clavulânico e 2% ceftriaxona (PEREIRA *et al.*, 2022).

A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* é considerada prioridade crítica na escala de importância epidemiológica pela Organização Mundial da Saúde, seu perfil de resistência a carbapenêmicos é bastante estudado. Contudo, em 2020, sua resistência era mais expressiva para cefalosporinas, já em 2021, além das cefalosporinas isolados de *Pseudomonas* apresentaram perfil de resistência a Piperaciclina/Tazobactam e carbapenêmicos (KIMOTO; MENDES, 2022).

Segundo os estudos de Santos (2004), *Pseudomonas aeruginosa* têm aumentado drasticamente seu percentual de resistência, ao passo que o *Staphylococcus epidermidis*, antes considerado componente natural da flora, agora têm sido causa de infecções hospitalares nos últimos anos. A *Serratia marcescens* além de resistir aos antibióticos vem sendo resistente também a soluções desinfetantes e antissépticas, que são utilizadas nos hospitais como medidas de controle desses microrganismos (TIMOTHY *et al.*, 2017).

4.5 Coinfecção bacteriana em período pandêmico de COVID-19

A atual pandemia da doença por coronavírus (COVID-19) colocou o sistema de saúde em uma crise sem precedentes. Aproximadamente 14,3% dos pacientes que apresentaram o vírus COVID-19 foram afetados por uma infecção bacteriana secundária. A coinfecção bacteriana e a infecção bacteriana secundária em pacientes hospitalizados são consideradas fatores de risco críticos para a gravidade e as taxas de mortalidade (SINGH *et al.*, 2021).

Pesquisas com o patógeno *Acinetobacter baumannii* relatou o aumento do uso de antibióticos e de organismos resistentes a múltiplos medicamentos sendo um problema emergente nesta situação de pandemia. Os pacientes com COVID-19 que sofreram de infecção bacteriana têm um tempo de internação mais longo. Por conseguinte, a prática de controle de infecção deve ser estritamente conduzida para reduzir a infecção secundária ou associada aos cuidados de saúde (ASMARAWATI *et al.*, 2021).

Além dos mecanismos intrínsecos e componentes de virulência que as bactérias possuem em adquirir resistência antimicrobiana, há também a imunocompetência do paciente em progredir a doença viral inicial, cujo hospedeiro propicia condições favoráveis em que a célula bacteriana se mantenha aderida e/ou invada tecidos, resista aos mecanismos de defesa e/ou sobreviva ao tratamento terapêutico que está sendo utilizado no paciente (MARTIN; BACHMAN, 2018).

Surtos pandêmicos anteriores de infecções respiratórias virais relataram infecções bacterianas complicando o quadro clínico do paciente. Para isso, existem vários tipos de coinfeção na COVID-19, como: SARS-CoV-2 secundários após infecção bacteriana ou colonização; uma infecção mista entre pneumonia viral e bacteriana e superinfecção bacteriana secundária após infecção por SARS-CoV-2. Os mecanismos subjacentes dependem do início e envolvem interações complexas entre três agentes diferentes: vírus, hospedeiro e bactérias. Portanto, pode-se levantar a hipótese de que qualquer coinfeção piorará o desfecho e a gravidade em infecções virais (BENGOCHEA; BAMFORD, 2020).

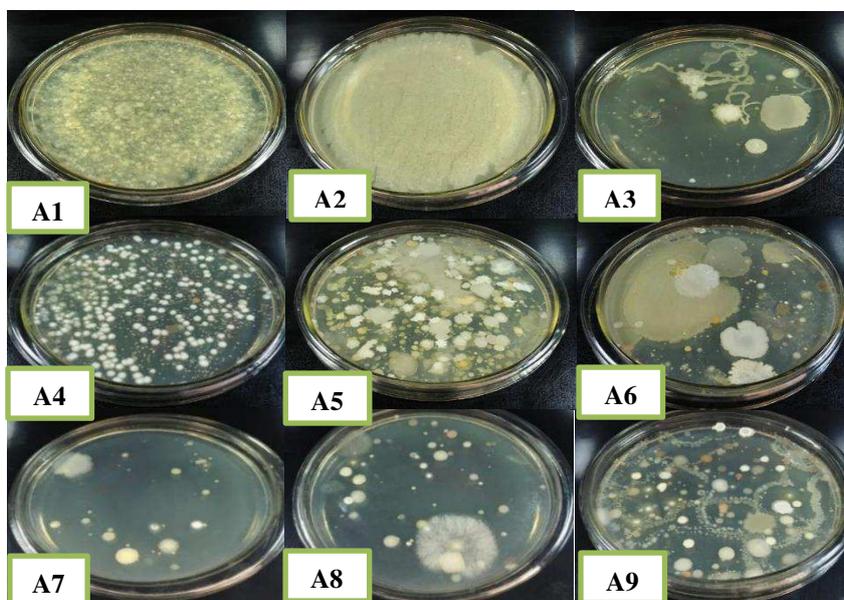
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

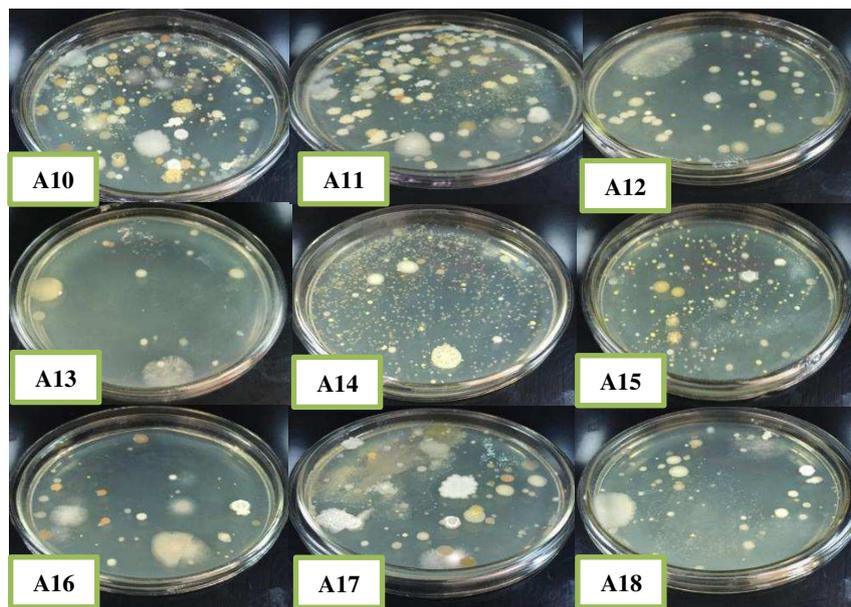
5.1 Cultivo dos Microrganismos

Os resultados do estudo revelaram uma diversidade significativa de populações bacterianas nas seis áreas analisadas em triplicatas do hospital. Foram isoladas 140 colônias, o que demonstra a heterogeneidade microbiana desse local e expressa a relevância de conhecer a presença de potenciais cepas patogênicas a saúde humana.

A figura 3 demonstra o crescimento microbiano cultivado bem como a alta contaminação e grau de variabilidade entre as espécies, das áreas e subáreas estudadas, sendo estas: o banheiro da maternidade representando o primeiro ponto de coleta refere-se as amostras do sanitário (A1), pia (A2) e corrimão (A3), respectivamente. Enquanto que a obstetrícia retrata as amostras coletadas de equipamentos (A4), maca (A5) e berço (A6). A sala de urgência caracteriza as amostras da bancada da sala (A7), armário de medicamentos (A8) e maca (A9). Já o Posto de urgência constitui as amostras do armário (A10), mesa (A11) e maçaneta (A12). Por sua vez, o laboratório de análises clínicas representa as amostras coletadas da maçaneta (A13), equipamento (A14) e bancada (A15). E por último, o departamento da pediatria, cujas amostras são da pia (A16), prateleira de medicação (A17) e armário de injetáveis (A18).

Figura 3 - Cultivo microbiano de amostras ambientais do Hospital de Cuité.





Fonte: Própria autora, 2021.

Com o cultivo foi possível observar uma complexa gama de bactérias presentes nas localidades do hospital. As placas apresentam um enorme número de colônias disponíveis, algumas com uma única característica fenotípica, outras com características morfológicas significativas, evidenciando tonalidades translúcidas, brancas, amareladas, alaranjadas, avermelhadas e marrons. Esta gama de patógenos das mais variadas formas é um dado preocupante, pois cada um desses poderá compreender um grau de periculosidade diferente. Esse conjunto de bactérias diferenciadas nos ambientes estudados denota a necessidade de conhecimento destes para futuras ações de controle mais efetivo de populações microbianas que podem ser responsáveis por acometimentos diversos em pacientes que frequentam este ambiente.

Na prática clínica padrão, classificar um isolado dentro da taxonomia bacteriana muito se baseia em características fenotípicas, como coloração de Gram, morfologia da colônia, caracterização bioquímica e sequenciamento de genomas (DINGLE; BUTLER-WU, 2013). Dessa forma, é possível vislumbrar, levando em consideração a morfologia das colônias e o meio de cultura utilizado que espécies prevalentes de infecções nosocomiais estão presentes nas amostras coletadas no Hospital de Cuité, podendo ser citadas a *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus ssp.* e *Acinetobacter ssp.* Essas espécies supracitadas denotam uma estimativa à representação morfológica da população bacteriana envolvidas em infecções presentes nos diversos ambientes hospitalares.

No âmbito hospitalar, a *E. coli* é um dos patógenos Gram-negativo que mais causa infecção, envolvido na sepse e choque induzido por endotoxina. Além de estar presente em doenças urinárias, diarreicas e pneumonia em pacientes imunossuprimidos (BEREKET *et al.*, 2012).

A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno associado a infecções hospitalares que são responsáveis, principalmente, por doenças urinárias e abdominais, relacionadas à dispositivos médicos, como os cateteres utilizados em diversos procedimentos clínicos (POMAKOVA *et al.*, 2012). Outra bactéria oportunista causadora de inúmeras infecções nosocomiais é a *Pseudomonas aeruginosa*, que também está associada a infecções do trato urinário e infecções do trato respiratório, possuindo a capacidade de formar biofilme nos mais variados ambientes. A formação de biofilme por esse microrganismo é referente a doenças pulmonares e a fibrose cística crônica (ONSARE; ARORA, 2015).

O patógeno *Acinetobacter baumannii* é um dos membros da gamaproteobactéria, de difícil caracterização com as demais espécies deste gênero. No entanto, com a presença de técnicas moleculares é possível distingui-los (WONG *et al.*, 2017). *A. baumannii* é um organismo que persiste no ambiente clínico através da sua capacidade de sobreviver em condições extremas, sendo a mais relevante do gênero *Acinetobacter* por desenvolver grande parte das infecções hospitalares (BENNETT; DOLIN; BLASER, 2019).

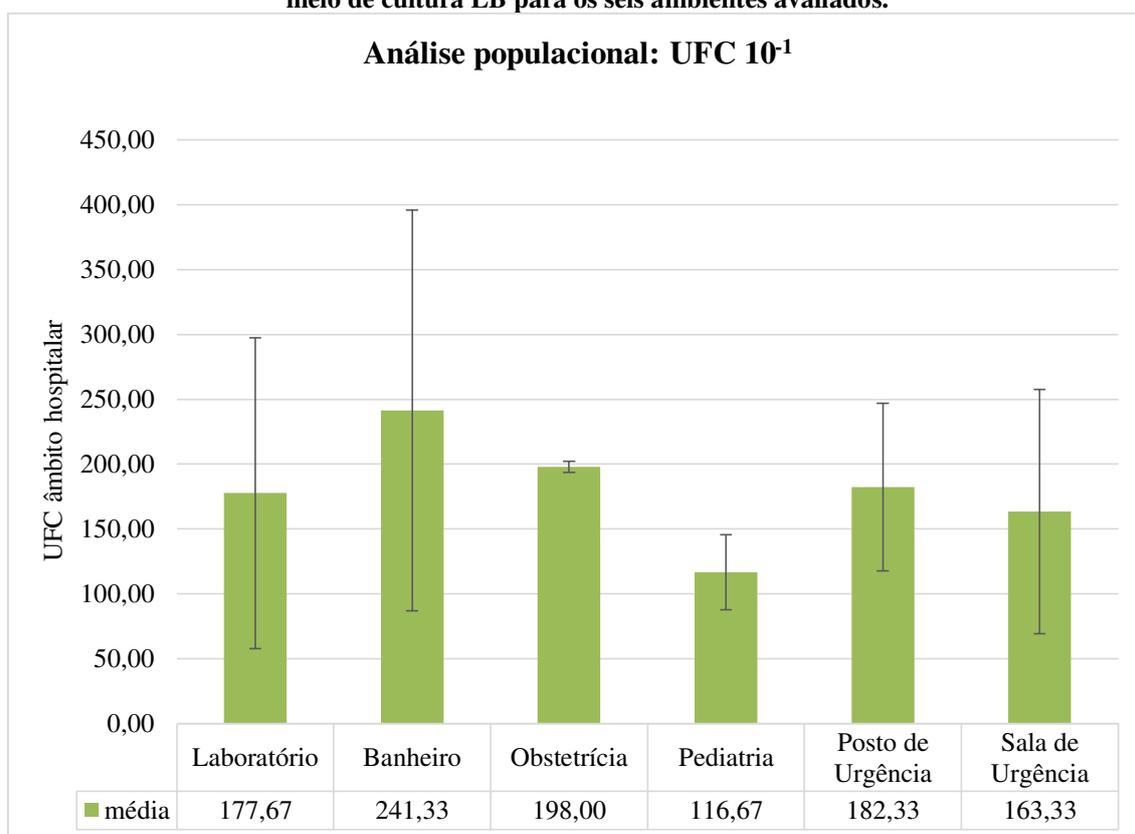
A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma Gram-positiva que faz parte da microflora humana, sendo encontrada no trato respiratório superior, principalmente. Contudo, este patógeno quando oportunista poderá desenvolver uma série de doenças graves, relacionadas as Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS), como a meningite e bacteremia (PAPADOPOULOS *et al.*, 2018). De forma semelhante, os *Enterococcus spp.* são Gram-positivos habitantes natural da cavidade oral, gastrointestinal e do trato genital feminino. Embora habitem nossa microbiota, as espécies desse gênero conseguem causar infecções no trato urinário, no sangue e até no sistema nervoso (MOHAMED; HUANG, 2007).

5.2 Contagem microbiana

A contagem em placas presume que cada bactéria viva cresça e tenha potencial de se dividir para produzir uma única colônia, embora isso nem sempre ocorra, pois, as bactérias desenvolvem-se em agregados celulares ou até mesmo cadeias. Dessa forma, uma única bactéria pode dá origem tanto a uma colônia como a um agregado microbiano.

Contabilizar as UFCs em uma determinada suspensão bacteriana pode ser realizada por diferentes metodologias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Uma delas é a contagem direta em placas, sendo esta a mais utilizada para medir populações bacterianas e sua grande vantagem é a medição de células viáveis, uma vez contada o número de colônias por placa, com auxílio da câmera de Neubauer, é realizada a média dos 6 seis pontos de coleta que foram selecionados para estudo em triplicatas, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1 - Média dos valores das Unidades Formadoras de Colônias após 72 horas de incubação em meio de cultura LB para os seis ambientes avaliados.



Fonte: Própria autora, 2021.

O banheiro da maternidade foi o ambiente que apresentou maior quantidade de microrganismos em relação aos demais, totalizando 241,33 UFCs. Por conseguinte, as demais áreas analisadas (Laboratório, Obstetrícia, Pediatria, Posto e Sala de urgência) também merecem destaque, com uma média entre 100 e 200 UFC, indicando que a contaminação bacteriana é alta o suficiente para representar uma ameaça, reforçando, assim a necessidade de melhores práticas de controle de infecção utilizando provavelmente descontaminantes mais efetivos.

Uma pesquisa realizada por Saadi *et al* (2021) caracterizou comunidades bacterianas isoladas de superfícies hospitalares negligenciadas após rotina de limpeza em

um hospital público argelino. A contaminação por bactérias em maçanetas, recepções e telefones fixos gerou 108 colônias. O grupo dominante foram as Bactérias Gram negativas com 62,03% representado pelas *Enterobacteriaceae*, enquanto que as Gram positivas o principal patógeno expandido foi *Staphylococcus aureus* com 15,74%.

Uma pesquisa realizada em 2021 na cidade de Recife-PE, afirmou que os locais que representam os maiores riscos em termos de contaminação de microrganismos bem como do coronavírus são em ambientes hospitalares com foco em maçanetas, interruptores ou catracas e em terminais de ônibus (SILVA *et al.*, 2021). No entanto, é sabido que a presença de bactérias é comum em superfícies inanimadas e equipamentos, e é por essa razão que as medidas de limpeza e desinfecção devem ser criteriosas, independente da restrição ao número de pessoas que frequentam aquele ambiente. Isto comprova que em todos os setores do hospital, sem exceção, devem ser realizadas rotinas de limpeza para que assegurar a qualidade sanitária desses microrganismos.

Durante a pandemia de COVID-19, máscaras, luvas e desinfetantes para as mãos foram usados para prevenir a transmissão do vírus. E por isso, a prevalência de infecção hospitalar respiratória, predominada pelos patógenos *Acinetobacter*, *Enterobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, foram reduzidas significativamente (SU *et al.*, 2021). Assim, as medidas de prevenção e controle da pandemia reduziram as taxas de infecções nosocomiais em muitos departamentos hospitalares, demonstrando a efetividade de protocolos de higiene do corpo clínico e ambiental mais rígidos.

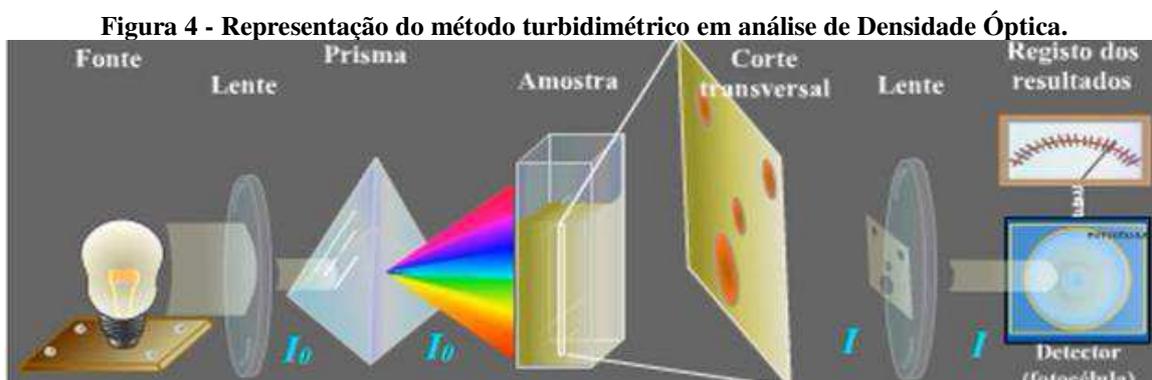
A contaminação de locais aparentemente limpos corrobora com a possibilidade da disseminação de patógenos, locais esses analisados como superfícies limpas, sem aparente sujidade, fazendo com que muitas vezes sejam ignoradas medidas eficazes de limpeza. O trânsito de pessoas, visitantes na unidade e, conseqüentemente, o contato com pacientes, objetos e superfícies aumenta a possibilidade de propagação de microrganismos (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2010). Portanto, é provável que no Hospital de estudo, uma parcela bacteriana tenha ressurgido após a limpeza, bem como os métodos utilizados para limpar não tenham removido adequadamente as bactérias das superfícies. Isto é um pressuposto para que rotinas de limpeza e materiais e soluções utilizadas sejam revistas para melhor alcançar o objetivo que é a desinfecção dos ambientes.

Para este fim, o monitoramento microbiano de superfícies hospitalares pode ajudar a identificar áreas-alvo e melhorar a prevenção e controle de infecções (IPC).

Logo, a implementação de práticas de IPC pode ajudar a reduzir o risco de infecções. Contudo, foi visto que em alguns hospitais mesmo realizando a limpeza subótima, as superfícies permanecem contaminadas com patógenos microbianos (ODOYO *et al.*, 2021). Essa contaminação residual ocorre em parte porque muitos hospitais realizam apenas inspeções visuais dos ambientes hospitalares para avaliar os procedimentos de limpeza, ao invés do biomonitoramento efetivo utilizando técnicas mais apuradas de microbiologia ou até mesmo de genética molecular.

Outro método para quantificar microrganismos é a turbidimetria, que se trata de um método indireto em que são contadas as células totais (células mortas e vivas) por meio da turvação do meio líquido, onde se dá o crescimento microbiano. A turbidez é obtida por meio do espectrofotômetro, que mede a intensidade da radiação, para um determinado comprimento de onda estabelecido, desviada e/ou absorvida (VERMELHO *et al.*, 2011).

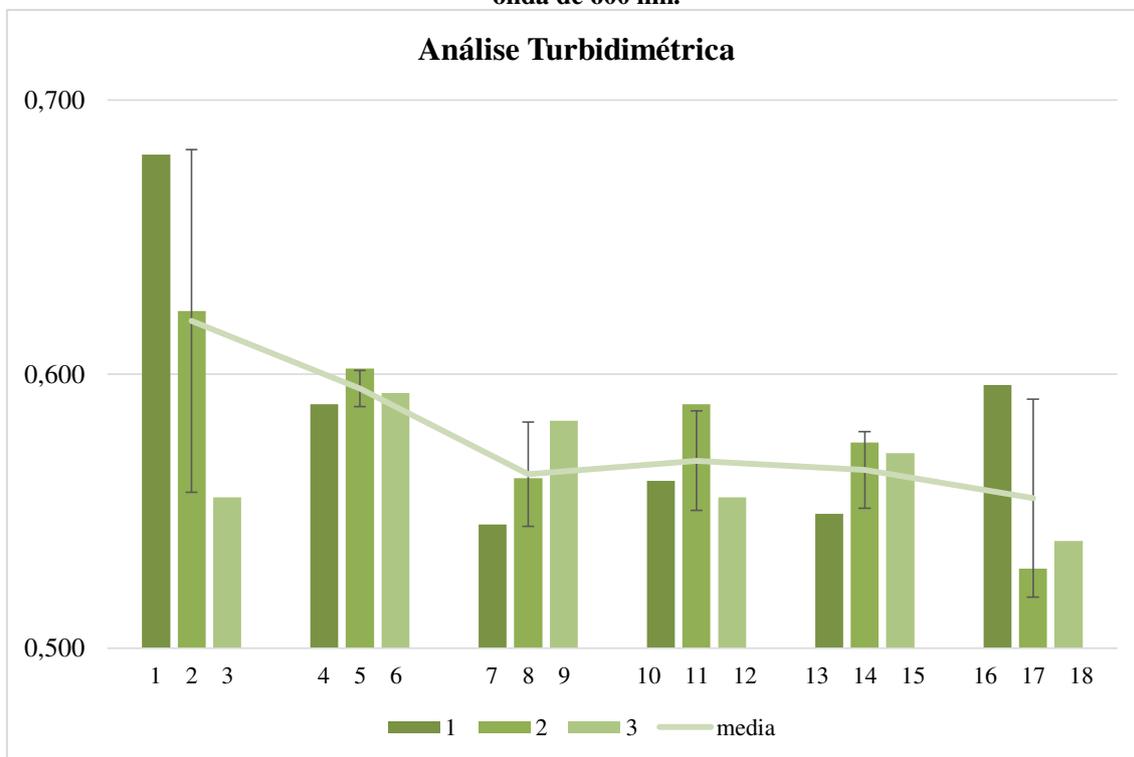
Dentro do espectrofotômetro a luz incidirá sobre a suspensão bacteriana até um detector fotossensível. Com o aumento no número de bactérias em suspensão, menos luz atingirá o detector. Essa alteração é registrada pela escala do próprio instrumento em termos de porcentagem de transmissão, pois são grandezas complementares. A densidade óptica (absorbância), por sua vez, é a unidade de medida da turvação do meio, isto é quanto maior a turbidez da suspensão maior será sua absorbância, em contrapartida, menor será a quantidade de luz transmitida (transmitância), como mostra a figura 4 (VERMELHO *et al.*, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).



Na Figura 4 observa-se a representação do método turbidimétrico para a quantificação indireta do crescimento bacteriano. Os raios de luz que incidem sobre a suspensão bacteriana são dispersos, pois algo (microrganismos) estará impedindo a total passagem do feixe de luz enquanto os não dispersos, são registrados em termos de luz

transmitida (PINHEIRO, 2015). Com isso, a leitura no espectrofotômetro consegue representar graficamente o crescimento microbiano, através da turvação do meio, que foi analisada como parâmetro para estimar a concentração celular total das amostras, ou seja, quantificando a massa de microrganismos que estão presentes, como mostra o gráfico 2.

Gráfico 2 - Contagem indireta das amostras utilizando método turbidimétrico com comprimento de onda de 600 nm.



Fonte: Própria autora, 2021.

O gráfico 2 exibe 18 amostras, das quais as de número 1 (sanitário do banheiro), 2 (Pia do banheiro), 5 (maca da obstetrícia) e 16 (Pia da pediatria) apresentaram maior absorbância, 0,680; 0,623; 0,602 e 0,596, respectivamente. Logo, é possível afirmar que nesses locais houve um maior crescimento microbiano comparado aos demais, bem como está explícito para comparação com o cultivo microbiano, onde essas mesmas amostras em placas de petri demonstraram elevados números de UFCs a 10^{-1} .

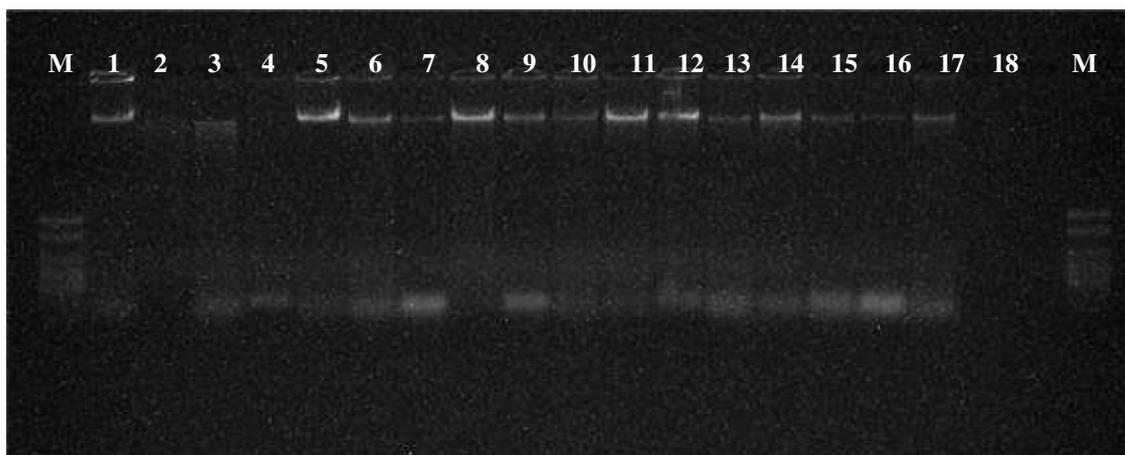
Segundo Miranda e colaboradores (2017) a leitura da densidade óptica (O.D.) e unidades formadoras de colônia com placas a 10^{-1} de 21 isolados bacterianos obtiveram uma faixa de absorbância entre 0,240 para a bactéria *Arthrobacter nicotinovorans* a 0,964 para a bactéria *Rummeliibacillus stabekisii*. Esse estudo corrobora com os resultados expresso no gráfico 2, que analisou a turbidimetria também a uma proporção de 10^{-1} de suspensões bacterianas coletadas no ambiente hospitalar do município de Cuité.

5.3 Extração de DNA Metagenômico (DNAm)

A fim de monitorar o ambiente estudado e prevenir infecções bacterianas, um repertório de técnicas laboratoriais foi realizado. Sendo uma delas o isolamento do DNA genômico, incluindo ruptura celular, extração e recuperação de DNA. A lise das células bacterianas é uma etapa crítica neste processo que ocorre com o auxílio do reagente CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio (CLARK *et al.*, 2013). O clorofórmio e álcool isoamílico são utilizados, pois melhoram a detecção de comunidades bacterianas por meio de lise eficiente de microrganismos e uma melhor qualidade do DNA extraído (PÉREZ-BROCAL *et al.*, 2020). Esse protocolo de extração utilizado após enriquecimento das amostras com meio de cultivo demonstrou eficiência em obter o DNA para as técnicas moleculares empregadas.

A extração do material genético das amostras representa a etapa essencial na obtenção de DNA de boa qualidade. Portanto, é imprescindível avaliar as metodologias disponíveis para esse processo, otimizando os protocolos e procedimentos que proporcionem quantidade, pureza e integridade suficientes ao DNA, obtendo assim amostras de alta viabilidade, como mostra a maioria das extrações na figura 5.

Figura 5 - Extração de DNA metagenômico dos ambientes avaliados.



Legenda- Extremidades marcador de peso Molecular DNA Ladder 100pb (M). Amostras de 1 a 3 Posto da urgência; 4 a 6 banheiro da maternidade; 7 a 9 pediatria; 10 a 12 laboratório; 13 a 15 obstetrícia; 16 a 18 sala de urgência.

Fonte: Própria autora, 2021.

A remoção de contaminantes é um fator chave importante para uma PCR bem-sucedida, posto que a qualidade e a integridade do DNA afetarão diretamente os resultados

de todos os procedimentos subsequentes (CLAASSEN-WEITZ *et al.*, 2020). Apesar dos rastros observados abaixo das amostras de DNA extraídas elas expressaram prosperidade frente as ampliações dos genes 16S rRNA. Esses rastros podem ser provenientes de substâncias aromáticas dificilmente separadas no protocolo de extração do DNA pelo método CTAB.

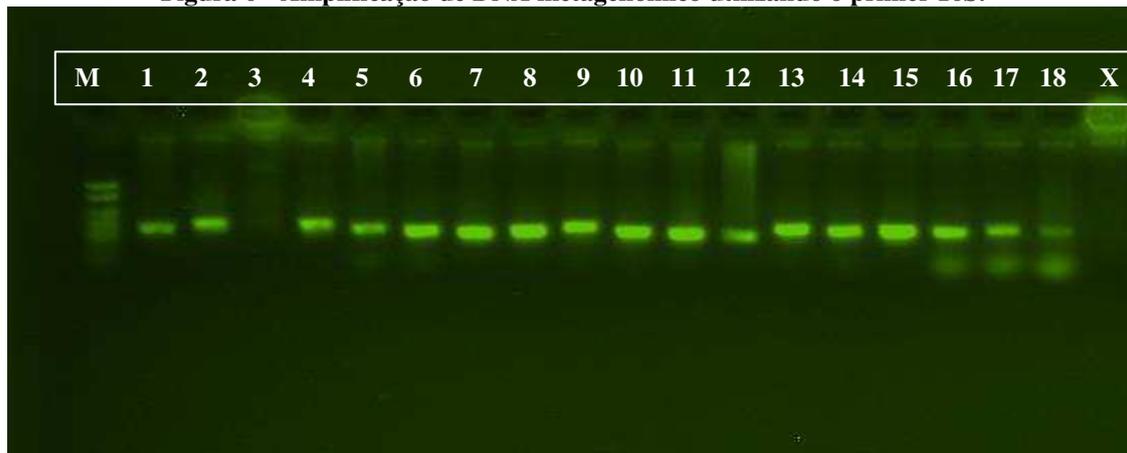
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para as reações com o gene 16S rRNA foram utilizados conjuntos de primers específicos, sendo estes já descritos na literatura para o 16S rRNA. Os primers desenvolvidos pelo grupo de pesquisa foram denominados de ISBAf e ISBAr. Estes foram elaborados utilizando milhares de sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI e do RDP-II. Na figura 6 é possível observar a clareza na distribuição dos amplicons.

Todos os microrganismos têm pelo menos uma cópia do 16S, tornando-o onipresente e, como é altamente conservado e evolui lentamente, é o alvo único mais amplamente utilizado para estudos filogenéticos e caracterização taxonômica de bactérias e arqueias. Este gene possui aproximadamente 1600 pares de bases de comprimento e inclui nove regiões hipervariáveis de conservação (V1-V9). Regiões mais conservadoras são úteis para determinar os táxons de classificação mais alta, enquanto aquelas de evolução mais rápida podem ajudar a identificar gêneros ou espécies (BUKIN *et al.*, 2019).

Church e pesquisadores (2020) salientaram que *primers* com construções semelhantes ao ISBA geralmente têm como alvo os primeiros 500 pb do gene da subunidade ribossômica pequena, pois a análise das regiões V1-V3 é considerada suficiente para permitir a identificação precisa da maioria dos gêneros e espécies. Portanto, a maioria das sequências 16S atualmente depositadas em bancos de dados públicos correspondem a essa parte do gene. Sendo assim, a metodologia empregada para a construção dos *primers* bem como para sua aplicação, seja para sequenciamento direto ou para construção de bibliotecas genômicas, se mostrou efetiva podendo contribuir substancialmente para o isolamento e análise global das populações microbianas, como mostra a figura 6.

Figura 6 - Amplificação de DNA metagenômico utilizando o primer 16S.



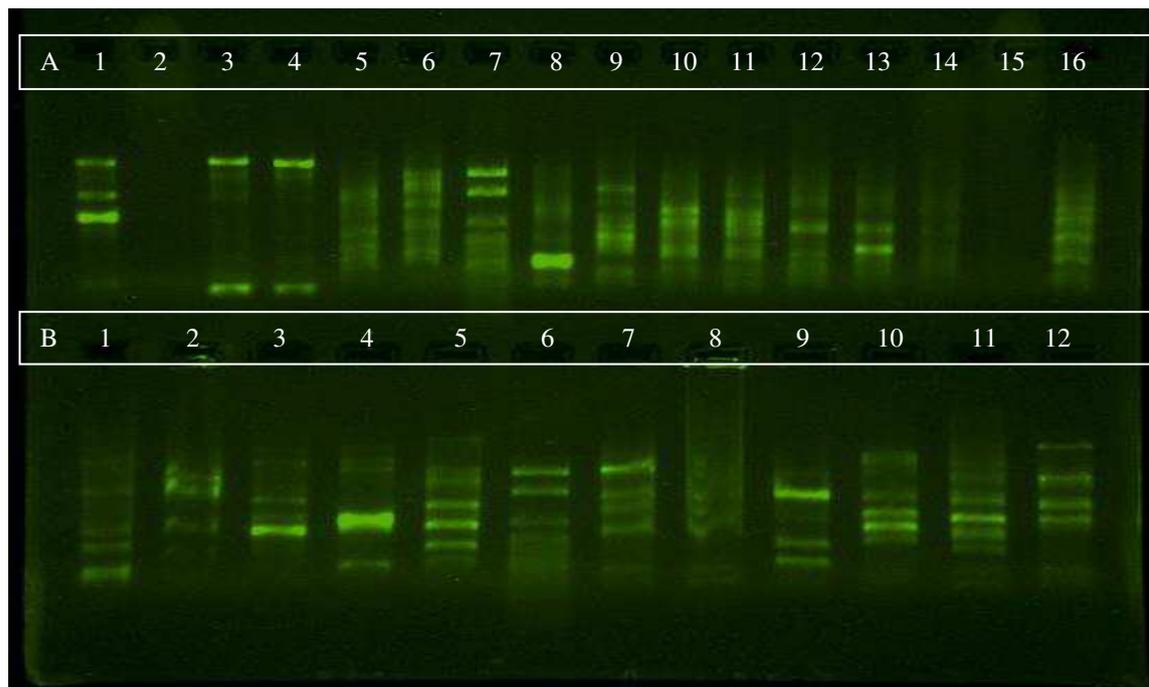
Legenda - Extremidades marcador de peso Molecular DNA Ladder 100pb (M). Amostras de 1 a 3 Posto da urgência; 4 a 6 banheiro da maternidade; 7 a 9 pediatria; 10 a 12 laboratório; 13 a 15 obstetrícia; 16 a 18 sala de urgência; X – Controle negativo.

Fonte: Própria autora, 2021.

A figura 6 demonstra a amplificação das amostras e a plenitude da eficiência dos primers utilizados, as bandas claras e fortes analisadas em gel de agarose concordam com a qualidade da amplificação do gene 16S.

Outra técnica empregada na identificação de diferentes organismos seja para caracterização ou para estudos prévios é a técnica de RAPD (Polimorfismos no DNA Amplificados Aleatoriamente) como mostra a figura 7, que apesar de ser um marcador molecular dominante, ou seja, não distinguir heterozigotos de homozigotos (MEDRAOUI *et al.*, 2007), dependendo do objetivo que se pretende alcançar, muitas informações importantes podem ser obtidas para selecionar material genético de interesse.

Figura 7 - Amplificações RAPD com linhagens aleatórias utilizando os primers H09 (linha A) e N15 (linha B).



Fonte: Própria autora, 2021.

É uma tendência no uso de *primers* RAPD que eles sejam curtos e que tenham temperaturas de *melting* baixas para favorecer a amplificação aleatória das sequências inespecíficas randômicas em reações de PCR nos organismos estudados (SANTOS *et al.*, 2010). Contudo, melhorias nos parâmetros de reação podem tornar os *primers* mais seletivos e com uma maior reprodutibilidade experimental. Neste caso foi utilizada uma temperatura de 50°C para o anelamento dos *primers* e um tempo curto de 30 segundos. Isto favorece a execução do experimento e diminui os produtos inespecíficos da reação aumentando a confiabilidade do experimento e permitindo a obtenção de padrões de bandeamento mais eficientes e contáveis com maior facilidade, como exibe a figura 7.

É possível perceber a semelhança genética entre certas bactérias e a diferença genética entre outras, permitindo inferir que certos isolados são na verdade bactérias idênticas geneticamente e outros isolados são realmente organismos únicos que fazem parte da coleção de microrganismos do trabalho. Dessa forma, possibilitando a compreensão de que há padrões com caráter monomórficos, apresentando estruturas essencialmente semelhantes como as amostras 3 (corrimão do banheiro) e 4 (berço da obstetrícia) da linha A, e caráter polimórficos, apresentando variações como a amostra 5 (maca da obstetrícia) e 6 (equipamento da obstetrícia) da linha B. Esta análise ainda permite inferir que a

composição microbiana dos itens avaliados de um mesmo ambiente difere em suas características genótípicas, como é apresentado nas amostras 5 e 6 da obstetrícia, ou seja, expressando a multiplicidade das espécies.

Foram utilizados dois primers RAPD para a construção desses perfis, o H09 e o N15 descritos por Santos e colaboradores (2010). Esses *primers* foram desenvolvidos para analisar inicialmente acessos de cultivares de sorgo, mas os resultados se mostraram efetivos em bactérias gerando perfis reproduzíveis, como também diferenciados para microrganismos iguais ou diferentes respectivamente.

De acordo com os *primers*, percebeu-se que o número de bandas amplificadas variou, uma vez padronizadas em bandas de alta intensidade e outras tênues ou menos intensas. A variação na intensidade das bandas pode ser explicada pelas diferenças no número de cópias amplificadas do fragmento, causadas pela competição entre produtos no processo de PCR, enquanto as bandas consideradas comuns são comparadas como presentes ou ausentes e convertidas em dados (1 ou 0, respectivamente), os quais são utilizados na análise de comparação entre os genótipos (BINNECK; NEDEL; DELLAGOSTIN, 2002). Para isso, análises futuras de matrizes binárias com coeficientes de similaridade podem ser empregadas para que esses perfis possam ser comparados e que seus padrões para determinadas espécies sejam definidos, favorecendo identificações futuras mais rápidas.

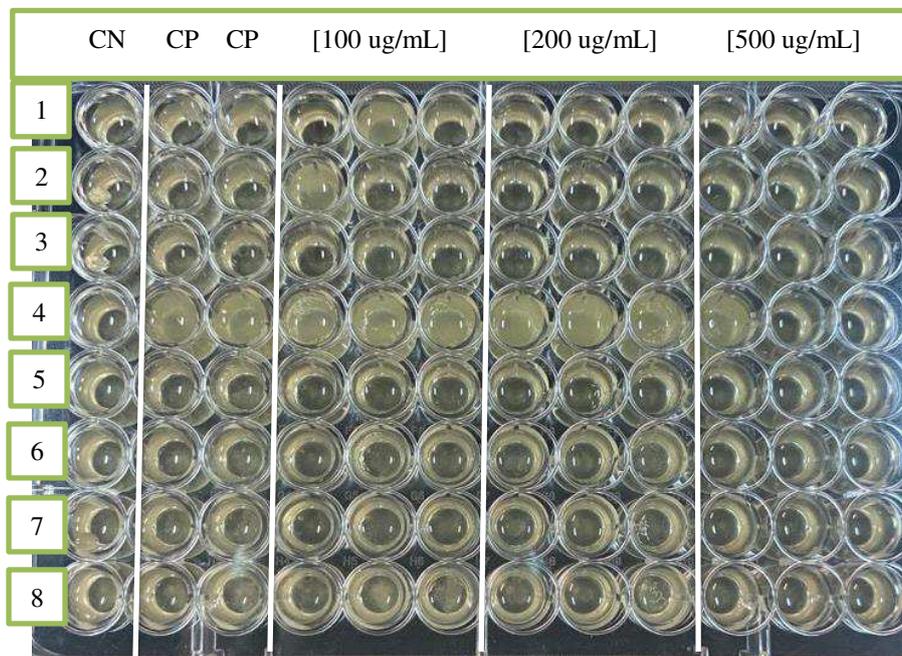
5.5 Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina

Hodiernamente, é sabido que o uso indiscriminado e automedicação por antibióticos aumentaram; esta prática exacerbada no período pandêmico intensificou ainda mais a resistência bacteriana a muitos outros medicamentos. À exemplo disso é a Ampicilina que embora já esteja entre os antibióticos resistentes a determinadas linhagens, quando em associações com outras substâncias ainda é bastante utilizado no tratamento de infecções oportunistas presentes no âmbito hospitalar, além de estar na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde em virtude da sua baixa toxicidade, baixo custo de produção e eficácia (LEE *et al.*, 2018).

Nesse contexto, com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana da Ampicilina foram selecionadas as áreas de maior contaminação para realizar uma triagem nas concentrações de 100 ug/mL, 200 ug/mL e 500 ug/mL do antibiótico estudado, distribuídos em poços juntamente com o inóculo e o meio de enriquecimento, como mostra

a figura 8. O parâmetro utilizado neste teste para avaliar o crescimento microbiano se deu através da visualização da turbidez do meio.

Figura 8 -Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina em placa de 96 poços nas concentrações [100 ug/mL], [200 ug/mL] e [500 ug/mL].



Legenda - banheiro da maternidade (1), berço da obstetrícia (2), equipamento do laboratório (3), pia do banheiro da maternidade (4), armário de medicamentos (5) e maçaneta (6), maca da sala de urgência (7) e armário de injetáveis da pediatria (8); CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo.

Fonte: Própria autora, 2021.

Analisando a figura 8, observa-se que a amostra 4 (pia do banheiro) apresentou turbidez nos poços de todas as concentrações de antibiótico testadas. Um estudo publicado na revista Science em 2016, trouxe demonstrações em larga escala de como uma bactéria reage a doses crescentes de antibióticos, em que a cada nível de concentração da droga, um pequeno segmento das bactérias se adaptava às condições adversas, resultado de sucessivas mudanças genéticas (BAYM et al., 2016). Dessa forma, ao se adaptar à determinada concentração, alta ou não, a bactéria ainda consegue se proliferar e prosseguir com sua patogenicidade, conforme evidenciado nesse ensaio.

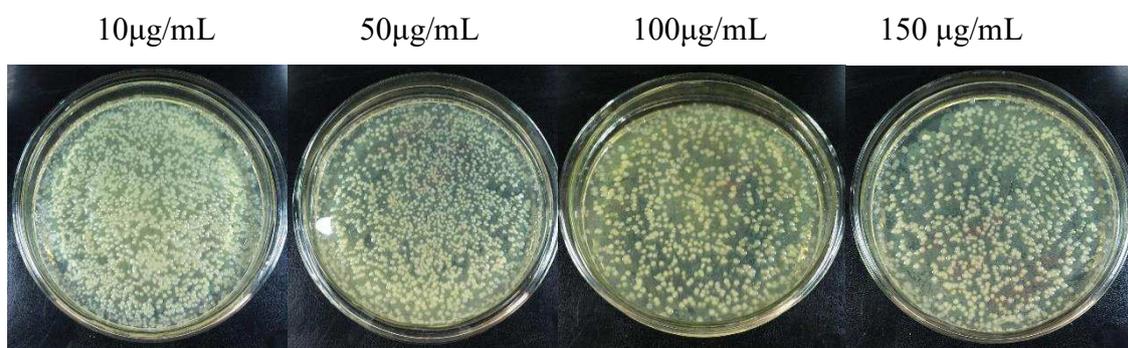
É notório que nem todos os poços presentes na microplaca expressaram turbidez acentuada, isto não quer dizer que inexistam bactérias ou que elas não possam se proliferar ou até mesmo se adaptar ao meio. Este experimento foi realizado por 3 dias. No estudo da Baym *et al* (2016) alguns experimentos duraram mais de 30 dias e ainda sim mostraram

adaptação e crescimento bacteriano. Percebe-se que a amostra 4, apresentou maior crescimento, atestando resistência à Ampicilina em altas concentrações. Isso mostra o quanto as terapias farmacológicas diminuem ao longo do tempo, ao mesmo passo que as bactérias se tornam cada vez mais ameaçadores à sociedade. Além disso, as amostras 6, 7 e 8 também demonstraram visualmente uma tendência na queda do crescimento na medida que a concentração de antibiótico aumenta. Vários insights podem ser tirados sobre este teste ensejando a possibilidade de trabalhos futuros que utilizem esses testes rápidos para controle da qualidade de limpeza e desinfecção hospitalar, independentemente do isolamento e identificação das bactérias presentes.

Hospitais e superfícies são reservatórios negligenciados para uma série de microrganismos que podem impactar diretamente a saúde humana por meio de contaminações ou infecções (NOGUEIRA, 2009). Assim, a análise microbiana de determinados locais auxilia na descoberta de novos métodos de controle e prevenção desses microrganismos, a pia do banheiro, designa uma superfície aparentemente limpa, mas que pode estar ocasionando maiores problemas para os enfermos, posto que bactérias e vírus não são observáveis a olho nu. Neste cenário, as inspeções devem dispor de metodologias mais seguras e eficazes.

Outro teste foi realizado para avaliar a atividade antibacteriana da Ampicilina, desta vez em placas de petri, nas concentrações 10µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 150 µg/mL. A amostra em estudo é referente ao sanitário do banheiro da maternidade, a seguir na figura 9.

Figura 9- Amostras de bactérias resistentes a Ampicilina nas concentrações [10µg/mL], [50µg/mL], [100µg/mL] e [150 µg/mL], coletadas no sanitário do banheiro da maternidade.



Fonte: Própria autora, 2021.

Qualquer organismo pode sofrer alterações genéticas e dar saltos evolutivos rápidos capazes de infectar outras espécies ou de se tornarem resistentes aos tratamentos conhecidos (GASPAR *et al.*, 2007). Portanto, ao analisar a figura 9, é possível observar que houve uma redução no crescimento microbiano à medida que as doses de Ampicilina são ajustadas, contudo, pouco significativa, uma vez que a resistência presente na concentração 150 µg/mL é bastante expressiva.

De acordo com Pires *et al* (2007) as bactérias apresentam alta resistência a ampicilina, porém esse antibiótico ainda tem ação antimicrobiana e deve ser usado em casos que as bactérias são mais resistentes aos outros antibióticos ou quando o paciente possui sensibilidade aos outros medicamentos.

A associação da Ampicilina com sulbactam são realizadas no intuito de melhorar a sua eficácia. Assim como estudos investigam a conjugação de antibióticos a nanopartículas de prata que consigam o êxito da atividade antimicrobiana contra microrganismos multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Por conseguinte, a ampicilina conjugada com nanopartículas de prata apresentou atividade melhorada contra cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* (MUREI *et al.*, 2020).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o exposto, conclui-se que os resultados encontrados neste estudo refletem um nível alto de contaminação, levando em consideração que as superfícies, equipamentos, macas, salas de urgência, laboratório, leitos e outras áreas do Hospital estavam altamente infectadas, como exige os resultados supracitados. Assim, diante das observações da disseminação de patógenos no ambiente hospitalar, faz-se necessário maior entendimento, controle das fontes e disponibilização de recursos, considerando que o conhecimento destes microrganismos é relevante para otimizar o tratamento das infecções e estabelecer medidas preventivas.

A presença de microrganismos em ambientes seja ele qual for não é um fato surpreendente, é uma realidade. Mas, ainda importuna os órgãos de saúde mundiais, este não é um problema Cuiteense e sim global, uma vez que uma porcentagem significativa de vírus e bactérias podem ser biomonitorados com inspeções frequentes e/ou investimentos em estudos moleculares para identificação microbiana naquela determinada população e assim, buscar métodos eficientes e específicos para este fim, auxiliando no domínio das bactérias e posteriormente das infecções nosocomiais.

As técnicas moleculares demonstraram eficácia e qualidade para um futuro sequenciamento e apesar de todas as particularidades que os métodos dependentes e independentes de cultura baseados na microbiologia molecular, possuam, elas permitem a compreensão de microbiomas de hospitais e outros ambientes mesmo que de modo global e superficial.

É imprescindível a preocupação com o uso arbitrário de antibióticos pela sociedade, sendo nítida a adaptação e resistência das bactérias à Ampicilina no presente estudo, mesmo em altas concentrações da droga. Não apenas desenvolvendo resistências, como também dificultando o tratamento de infecções nosocomiais. Portanto, monitorar e prevenir infecções hospitalares são medidas essenciais na eficácia e qualidade dos cuidados em saúde, bem como, o fornecimento de informações importantes como o desenvolvimento deste trabalho auxilia na introdução de programas eficientes e profiláticos em hospitais.

REFERÊNCIAS

- AGABA, P, TUMUKUNDE, J, TINDIMWEBWA, J. V. B, KWIZERA, A. Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ARAÚJO, BEATRIZ TORRES; PEREIRA, DANIELLA CRISTINA RODRIGUES. Políticas para controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil, 2017. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 28, n. 03/04, p. 333-342, 2017.
- ARAÚJO, P. L., DE MENDONÇA, A. E. O., DE MEDEIROS, R. Á., DE NETO, V. L. S., NOBRE, T. T. X., & COSTA, I. K. F. Prevalência de infecção relacionada à assistência à saúde em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Enfermería Global**, v. 17, n. 4, p. 278-315, 2018.
- ASENSIO, A., OLIVER, A., GONZÁLEZ-DIEGO, P., BAQUERO, F., PÉREZ-DÍAZ, J. C., ROS, P., CANTÓN, R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 55-60, 2000.
- ASMARAWATI, T. P., ROSYID, A. N., SURYANTORO, S. D., MAHDI, B. A., WINDRADI, C., WULANINGRUM, P. A., NASRONUDIN, N. The clinical impact of bacterial co-infection among moderate, severe and critically ill COVID-19 patients in the second referral hospital in Surabaya. **F1000Research**, v. 10, n. 113, p. 113, 2021.
- BAYM, M., LIEBERMAN, T. D., KELSIC, E. D., CHAIT, R., GROSS, R., YELIN, I., & KISHONY, R. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1147-1151, 2016.
- BENGOECHEA, JOSE A.; BAMFORD, CONNOR GG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19?. **EMBO molecular medicine**, v. 12, n. 7, p. e12560, 2020.
- BENNETT, JOHN E.; DOLIN, RAPHAEL; BLASER, MARTIN J. Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases E-book. **Elsevier Health Sciences**, 2019.
- BEREKET, W., HEMALATHA, K., GETENET, B., WONDWOSSEN, T., SOLOMON, A., ZEYNUDIN, A., & KANNAN, S. Update on bacterial nosocomial infections. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 16, n. 8, p. 1039-44, 2012.
- BINNECK, ELISEU; NEDEL, JORGE LUIZ; DELLAGOSTIN, ODIR A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 183-196, 2002.
- BLAIR, JESSICA MA; RICHMOND, GRACE E.; PIDDOCK, LAURA JV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165-1177, 2014.

BOADA, A.; PONS-VIQUÉS, M.; REAL, J.; GREZNER, E.; BOLÌBAR, B.; LLOR, C. Previous antibiotic exposure and antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* in Spanish primary care. **European Journal of General Practice**, v.24, n.1, p.125-130, 2018.

BRASIL - ANVISA. Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. **Bases teóricas e uso clínico**. 2007. 1p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 24 set. 2022.

BREIJYEH, ZEINAB; JUBEH, BUTHAINA; KARAMAN, RAFIK. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.

BUKIN, Y. S., GALACHYANTS, Y. P., MOROZOV, I. V., BUKIN, S. V., ZAKHARENKO, A. S., ZEMSKAYA, T. I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. **Scientific Data**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2019.

CHNG, K. R., LI, C., BERTRAND, D., NG, A. H. Q., KWAH, J. S., LOW, H. M., NAGARAJAN, N. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 941-951, 2020.

CHURCH, D. L., CERUTTI, L., GÜRTLER, A., GRIENER, T., ZELAZNY, A., & EMLER, S. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. e00053-19, 2020.

CLAASSEN-WEITZ, S., GARDNER-LUBBE, S., MWAIKONO, K. S., DU TOIT, E., ZAR, H. J., NICOL, M. P. Optimizing SS rRNA gene profile analysis from low biomass nasopharyngeal and induced sputum specimens. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-26, 2020.

CLARK, A. E., KALETA, E. J., ARORA, A., & WOLK, D. M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

DALTON, K. R., ROCK, C., CARROLL, K. C., & DAVIS, M. F. One Health in hospitals: how understanding the dynamics of people, animals, and the hospital built-environment can be used to better inform interventions for antimicrobial-resistant gram-positive infections. **Antimicrobial Resistance & amp Infection Control**, v. 9, p. 1-17, 2020.

SILVA, S. J. R., DO NASCIMENTO, J. C. F., DOS SANTOS REIS, W. P. M., DA SILVA, C. T. A., DA SILVA, P. G., MENDES, R. P. G., PENA, L. Widespread contamination of SARS-CoV-2 on highly touched surfaces in Brazil during the second wave of the COVID-19 pandemic. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 7382-7395, 2021.

DINGLE, TANIS C.; BUTLER-WU, SUSAN M. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. **Clinics in laboratory medicine**, v. 33, n. 3, p. 589-609, 2013.

DOYLE, MICHAEL P.; SCHOENI, JEAN L. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2394-2396, 1987.

GASPAR, A., CORREIA, C. P., AVELAR, T., MATEUS, O., & ALMADA, F. Evolução e criacionismo: uma relação impossível. **Ouasi. Famalicão**, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HABBOUSH Y.; GUZMAN N. Antibiotic Resistance. StatPearls. **TreasureIsland (FL): Stat Pearls Publishing**, 2020.

HERMANN, THOMAS. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **Journal of biotechnology**, v. 104, n. 1-3, p. 155-172, 2003.

HOU, X. H., SONG, X. Y., MA, X. B., ZHANG, S. Y., & ZHANG, J. Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 759-768, 2015.

HOVER, B. M., KIM, S. H., KATZ, M., CHARLOP-POWERS, Z., OWEN, J. G., TERNEI, M. A., ... & BRADY, S. F. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Nature microbiology**, v. 3, n. 4, p. 415-422, 2018.

JAKA, H.; RHEE, J. A.; ÖSTLUNDH, L.; SMART, L.; PECK, R.; MUELLER, A.; MSHANA, S. E. The magnitude of antibiotic resistance to *Helicobacter pylori* in Africa and identified mutations which confer resistance to antibiotics: systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v.18, n.1, p.193, 2018.

KIMOTO, EMILY AYUMI; MENDES, ELISA DONALISIO TEIXEIRA. Perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* em hospital terciário. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101762, 2022.

KOCH, A. M., NILSEN, R. M., ERIKSEN, H. M., COX, R. J., & HARTHUG, S. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.

KOCHINSKI, TAIS; BARBOSA, PATRÍCIA; ROMANELLO, LARISSA. Análise microbiológica de bactérias patogênicas em areias de praças públicas no município de União da Vitória-Paraná. **LUMINÁRIA**, 22, n. 01, p. 27-34, 2020.

KONEMAN, ELMER W.; ALLEN, STEPHEN. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. 6 Ed. **Médica panamericana**, 2008.

LAGIER, JEAN-CHRISTOPHE, PERRINE HUGON, SABER KHELAIFIA, PIERRE-EDOUARD FOURNIER, BERNARD LA SCOLA, AND DIDIER RAOULT. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota." **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 237-264, 2015.

LAX, S., SANGWAN, N., SMITH, D., LARSEN, P., HANDLEY, K. M., RICHARDSON, M., GILBERT, J. A. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. **Science translational medicine**, v. 9, n. 391, p. eaah6500, 2017.

LEE, A. S., DE LENCASTRE, H., GARAU, J., KLUYTMANS, J., MALHOTRA-KUMAR, S., PESCHEL, A., & HARBARTH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat. Revista Primers**. v. 31, p. 18033. 2018.

LÉPESOVÁ, K., OLEJNÍKOVÁ, P., MACKULAK, T., CVERENKÁROVÁ, K., KRAHULCOVÁ, M., & BÍROŠOVÁ, L. Hospital Wastewater—Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 21, p. 7827, 2020.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MEDRAOUI, L., ATER, M., BENLHABIB, O., MSIKINE, D., & FILALI-MALTOUF, A. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in northwestern Morocco by ISSR and RAPD markers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, n. 11, p. 789-797, 2007.

MIRANDA, G. D. S., DA CONCEIÇÃO, L. D., ENDERLE, D. C., FERREIRA, A., & WRUCK, D. S. Determinação da densidade óptica de isolados bacterianos antagonistas a *Fusarium Spp.* agente causal da fusariose do maracujazeiro. **VI Jornada Científica da Embrapa Agrossilvipastoril**, v. 1, p. 7, 2017.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

MOREIRA, S. M., DE OLIVEIRA MENDES, T. A., SANTANTA, M. F., HUWS, S. A., CREEVEY, C. J., MANTOVANI, H. C. Genomic and gene expression evidence of nonribosomal peptide and polyketide production among ruminal bacteria: a potential role in niche colonization?. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 2, p. fiz198, 2020.

MUREI, A., AYINDE, W. B., GITARI, M. W., & SAMIE, A. “Functionalization and antimicrobial evaluation of ampicillin, penicillin and vancomycin with *Pyrenacantha grandiflora* Baill and silver nanoparticles.” **Scientific reports** vol. 10,1 11596. 14 Jul. 2020.

NICOLAOU, K. C., PULUKURI, K. K., RIGOL, S., BUCHMAN, M., SHAH, A. A., CEN, N., SHAMOO, Y. Enantioselective total synthesis of antibiotic CJ-16,264, synthesis and biological evaluation of designed analogues, and discovery of highly potent and simpler antibacterial agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 44, p. 15868-15877, 2017.

NODARI, C. S.; BARTH, A. L. Antimicrobial resistance among enterobacteriaceae: focus on carbapenemase production. **Journal of Infection Control**. 5:1, 2016.

NOGUEIRA, PAULA SACHA FROTA. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev enferm UERJ**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

NOGUEIRA, H. S., DE OLIVEIRA XAVIER, A. R. E., DE SOUSA XAVIER, M. A., CARVALHO, A. A., MONÇÃO, G. A., BARRETO, N. A. P. Antibacterianos: Principais Classes, Mecanismos De Ação E Resistência. **Revista Unimontes Científica**, v. 18, n. 2, p. 96–108, 2016.

ODOYO, E., MATANO, D., GEORGES, M., TIRIA, F., WAHOME, S., KYANY'A, C., & MUSILA, L. “Ten Thousand-Fold Higher than Acceptable Bacterial Loads Detected in Kenyan Hospital Environments: Targeted Approaches to Reduce Contamination Levels.” **International journal of environmental research and public health** vol. 18,13 6810. 25 Jun. 2021.

OLIVEIRA, ADRIANA CRISTINA DE; DAMASCENO, QUÉSIA SOUZA. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 44, p. 1118-1123, 2010.

ONSARE, J. G.; ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 2, p. 313-325, 2015.

PAPADOPOULOS, P., PAPADOPOULOS, T., ANGELIDIS, A. S., BOUKOUVALA, E., ZDRAGAS, A., PAPA, A & SERGELIDIS, D. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. **Food microbiology**, v. 69, p. 43-50, 2018.

PARCELL, B. J., GILLESPIE, S. H., PETTIGREW, K. A., HOLDEN, M. T. Clinical perspectives in integrating whole-genome sequencing into the investigation of healthcare and public health outbreaks—hype or help?. **Journal of Hospital Infection**, v. 109, p. 1-9, 2021.

PEACOCK, S. J; PATERSON, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Biochem.** v. 84, p. 577–601, 2015.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6, 2018.

PEREIRA, F. G. F., CHAGAS, A. N. S. D., FREITAS, M. M. C., CAETANO, J. Á., BARROS, L. M. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 1, p. 70, 2016.

PEREIRA, M. L. S., GONÇALVES, S. S., CARVALHAIS, B. E. S., DOS SANTOS, K. V. Perfil de microrganismos e de resistência aos antimicrobianos em um hospital público de referência para tratamento de covid-19 no Espírito Santo antes e durante o primeiro ano da pandemia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101760, 2022.

PÉREZ-BROCAL, V., MAGNE, F., RUIZ-RUIZ, S., PONCE, C. A., BUSTAMANTE, R., MARTIN, V. S., MOYA, A. "Optimized DNA extraction and purification method for characterization of bacterial and fungal communities in lung tissue samples." **Scientific reports** vol. 10,1 17377. 15 Oct. 2020.

PIRES, M. C. D. S., FROTA, K. D. S., MARTINS JUNIOR, P. D. O., CORREIA, A. F., CORTEZ-ESCALANTE, J. J., SILVEIRA, C. A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 643-647, 2007.

POMAKOVA, D. K., HSIAO, C. B., BEANAN, J. M., OLSON, R., MACDONALD, U., KEYNAN, Y., RUSSO, T. A. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 981-989, 2012.

POPOWSKA, M.; RZECZYCKA, M.A; MIERNIK, A.; KRAWCZYK-BALSKA, A.; WALSH, F.; DUFFY, B. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.56, n.3, p.1434-1443, 2012.

PRESCOTT, S. L., LARCOMBE, D. L., LOGAN, A. C., WEST, C., BURKS, W., CARABALLO, L., CAMPBELL, D. E. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. **World Allerg. Org. J.** v. 10, p. 29, 2017.

RAYNER, C.; MUNCKHOF, W.J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 2, p. 3-16, 2005.

ROACH, D. J., BURTON, J. N., LEE, C., STACKHOUSE, B., BUTLER-WU, S. M., COOKSON, B. T., SALIPANTE, S. J. A year of infection in the intensive care unit: prospective whole genome sequencing of bacterial clinical isolates reveals cryptic transmissions and novel microbiota. **PLoS genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005413, 2015.

SAADI, S., ALLEM, R., SEBAIHIA, M., MEROUANE, A., & BAKKALI, M. Bacterial contamination of neglected hospital surfaces and equipment in an Algerian hospital: an important source of potential infection. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-9, 2021.

- SANTOS, I. L., SILVA, P. G., JÚNIOR, S. F. L., SOUZA, P. R., TABOSA, J. N., MAIA, M. M. Utilização de RAPD na caracterização molecular de acessos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) recomendados para o semi-árido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 60-66, 2010.
- SANTOS, NEUSA DE QUEIROZ. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SANTOS, R. P., MARIANO, L. R., DA SILVA TAKAHASHI, L., & DE FATIMA ERDMANN, M. Prevalência de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva - Um estudo retrospectivo. **Revista de Enfermagem da UFSM**, 4(2), 410-418, 2014.
- SINGH, V., UPADHYAY, P., REDDY, J., GRANGER, J. Coinfecções respiratórias por SARS-CoV-2: Incidência de co-patógenos virais e bacterianos. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 617-620, 2021.
- SOUZA, A. F. F. L.; OLIVEIRA, L. B.; MOURA, M. E. B. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 4, p. 11, 2016.
- SU, C., ZHANG, Z., ZHAO, X., PENG, H., HONG, Y., HUANG, L., BAI, Z. Changes in prevalence of nosocomial infection pre-and post-COVID-19 pandemic from a tertiary Hospital in China. **BMC infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2021.
- SZE, MARC A.; SCHLOSS, PATRICK D. The impact of DNA polymerase and number of rounds of amplification in PCR on 16S rRNA gene sequence data. **Mosphere**, v. 4, n. 3, p. e00163-19, 2019.
- TIMOTHY, J. K.; GRANT MILLS, J. S. P.; AMY DUMIGAN, C. G. F.; JOSÉ L. I.; REBECC, I., LAURA H.; JOSÉ A. B. Um mecanismo de resistência aos antibióticos *Klebsiella pneumoniae* que subjuga as defesas dos hospedeiros e promove virulência. **EMBO Molecular Medicine**. 9, 430-447, 2017.
- TORTORA, GERARD J.; CASE, CHRISTINE L.; FUNKE, BERDELL R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia. 8. ed.** Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2012.
- TUMUHAMYE, J., STEINSLAND, H., BWANGA, F., TUMWINE, J. K., NDEEZI, G., MUKUNYA, D., NANKABIRWA, V. Vaginal colonization with antimicrobial-resistant bacteria among women in labor in central Uganda: prevalence and associated factors. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2021.
- ULRICH-MERZENICH, GUDRUN SIGRID. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products potential and challenges for drug development. **Synergy**, v. 1, n. 1, p. 59-69, 2014.

VENTOSA, A.; DE LA HABA, R. R.; SÁNCHEZ-PORRO, C.; PAPKE, R. T. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. **Current opinion in microbiology**, v.25, p.80-87, 2015.

VERA-GARGALLO, B.; VENTOSA, A. Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the odiel saltmarshes (SW Spain). **Genes**, v.9, n.3, p.152, 2018.

VERMELHO, A. B; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, CARVALHO, IRINEIDE TEIXEIRA. T. **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 256p, 2011.

VON WINTERSDORFF, C. J., PENDERS, J., VAN NIEKERK, J. M., MILLS, N. D., MAJUMDER, S., VAN ALPHEN, L. B., WOLFFS, P. F. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 173, 2016.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health care associated infections Fact Sheet**. 2016.

Disponível: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>> Acesso em: 21. Set. 2022.

WILLIAMS, MICHAEL R.; GALLO, RICHARD L. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. **Current allergy and asthma reports**, v. 15, n. 11, p. 1-10, 2015.

WONG, D., NIELSEN, T. B., BONOMO, R. A., PANTAPALANGKOOR, P., LUNA, B., & SPELLBERG, B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

WU, J., HUANG, Y., RAO, D., ZHANG, Y., & YANG, K. Evidences for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. **Frontiers in microbiology**, v.9, p.745, 2018.