escola superior de enfermagem de coimbra

CURSO DE MESTRADO EM ENFERMAGEM

MÉDICO-CIRÚRGICA

Contaminação Ambiental num Hospital por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Mycobacterium* não *tuberculosis* e outros Microrganismos Oportunistas

Fernando José Gama da Costa

Coimbra, *abril* de *2013*



e s c o l a superior de enfermagem de coimbra

CURSO DE MESTRADO EM ENFERMAGEM

MÉDICO-CIRÚRGICA

Contaminação Ambiental num Hospital por *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Mycobacterium* não *tuberculosis* e outros Microrganismos Oportunistas

Fernando José Gama da Costa

Orientador: Doutor José Carlos Martins, Professor Adjunto da Escola Superior de Enfermagem de Coimbra

Coorientadora: Doutora Paula Morais, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Dissertação apresentada à Escola Superior de Enfermagem de Coimbra

para obtenção do grau de Mestre em

Enfermagem Médico – Cirúrgica

Coimbra, *abril* de *2013*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Paula Morais, sem a qual este trabalho não seria possível. Pelo convite para fazer parte do projeto onde este trabalho se insere. Pela orientação dada, quer ao nível científico quer ao nível pessoal.

Ao Professor Doutor José Carlos Martins, pela orientação ao nível científico e pessoal e pelo apoio e incentivo que me deu.

Ao Dr. Pedro de Abreu, pelo apoio no domínio científico, mas também no domínio pessoal. Esteve sempre comigo no desenvolvimento do trabalho laboratorial, validando aquilo que eu fazia e por vezes terminando tarefas que eu não conseguia por motivos profissionais ou familiares.

A toda a equipa do Laboratório de Microbiologia da FCTUC, pela forma como me receberam, por todo o apoio que me deram e pela sua amizade.

Ao Laboratório de Microbiologia do CHUC, em especial à Dr.ª Graça Ribeiro e à Dr.ª Luísa, que colaboraram com o estudo, cedendo as amostras clínicas.

Aos Enfermeiros Chefes e restante equipa de Enfermagem dos serviços onde se realizou o estudo, pela disponibilidade que sempre demonstraram.

À minha mulher e aos meus filhos, pela paciência nos momentos mais difíceis, por saberem compreender o pouco tempo que lhes dediquei nestes dois anos e pela ajuda que me deram na materialização deste documento.

Aos meus pais, que souberam compreender a minha ausência.

Aos meus amigos por compreenderem o pouco tempo que lhes dediquei.

RESUMO

As infeções associadas aos cuidados de saúde são um problema atual pelos custos, e pela taxa de morbilidade e mortalidade associadas. A transferência de doentes entre serviços e instituições, o uso por vezes abusivo de antibióticos, más práticas de cuidados e uma deficiente higienização de equipamentos de uso clínico, fazem com que seja difícil reduzir a sua prevalência. A prevenção é assim o aspeto fulcral em que os profissionais de saúde se devem centrar. Utilizando como objeto de estudo o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, foi objetivo determinar o grau de contaminação de equipamentos hospitalares e a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp* e *Micobacterium* não *tuberculosis* e a sua variabilidade genética em doentes internados no hospital e também no ambiente hospitalar.

Para tal, procedeu-se à recolha das amostras ambientais através de zaragatoa, sendo obtidas amostras em zonas húmidas e em zonas secas em três meses consecutivos. As amostras foram inoculadas por espalhamento em placas de Petri, em meios de cultura seletivos de acordo com os microrganismos em estudo. O laboratório de microbiologia do referido hospital, cedeu as amostras clínicas e respetivo perfil de sensibilidade a antibióticos para posterior comparação.

O nível de contaminação dos equipamentos foi dividido em três classes de acordo com o número de colónias recuperadas. As torneiras e os chuveiros foram os locais cujas amostras revelaram um maior número de colónias. Foram isoladas do ambiente, uma estirpe de *P.aeruginosa* e três estirpes de *Mycobacterium gordonae.* Não foi isolada nenhuma estirpe de *Klebsiella spp*. Quando comparados os isolados clínicos de *P. aeruginosa* com a estirpe ambiental, estes não revelaram provável origem clonal. Não foi identificada nenhuma estirpe clínica de *Mycobacterium* não *tuberculosis*. O estudo possibilitou ainda a identificação de outros microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem, alguns deles com provável origem clonal.

Os resultados trazem benefícios para a instituição, para a gestão e para a prática dos cuidados de enfermagem. Permitem a identificação de microrganismos potencialmente patogénicos presentes em equipamentos de uso clínico, alertando para a necessidade de melhor limpeza e desinfeção destes, e higienização das mãos de forma mais sistemática e cuidada.

ABSTRAT

Hospital acquired infections is a present-day problem due to expenses, the rate of morbidity and mortality associated to it. The transfer of patients between services and institutions, sometimes the abusive use of antibiotics, poor healthcare procedures and bad hygienic maintenance of clinical equipment, make it difficult to reduce its incidence.

Due to this, prevention is the key aspect that all healthcare professionals should take into account. Using the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra as our object of study, the aim was determining the degree of contamination of the hospital´s equipment and the prevalence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp* and *Mycobacterium tuberculosis* and genetic variability in patients admitted to the hospital and hospital environment.

To achieve this, we proceeded to the collecting of environmental samples using swabs; samples were obtained from wet and dry locations during three consecutive months. Samples were inoculated onto Petri dishes in selective culture media according to the microorganism in study. The microbiology laboratory of the hospital, gave clinical samples and the appropriate antibiotic sensitivity profile for comparison.

The level of contamination of the equipment was divided into three groups according to the number of colonies acquired. The taps and shower were areas where samples revealed a higher colony count. A strain of *P. aeruginosa* and three strains of *Mycobacterium gordonae*, were isolated from the hospital environment. No *Klebsiella* spp were no isolated

When comparing the clinical isolates of *P. aeruginosa* strains with the environmental isolate, it was proven to most likely not present the same clonal origin. There were no identified clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The study also enabled the identification of other potentially pathogenic microorganisms to humans, some of them with plausible same clonal origin.

The results bring benefits to healthcare institution, management and the practice of nursing. It allows the identification of potentially pathogenic organisms present in clinical equipment, prompting the need for better cleaning and disinfection of these, and a more systematic and careful procedure for hand hygiene.

SIGLAS

CA – Conselho de Administração

CCI- Comissão de Controlo da Infeção

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FCTUC – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

HF – Hospital de Faro

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

IACS - Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde

KIA – *Kigler`s Iron Agár,*

LB – *Luria Broth*

MNT – *Micobacterium* não *tuberculosis*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

P. *aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PIA - *Pseudomonas Isolation* Agar

PNCI – Programa Nacional de Controlo da Infecção

RAPD - *Randomly Amplified Polimorphic* DNA

RNA – Ácido Ribonucleico

UV - Ultravioleta

INDICE DE TABELAS

Pag.

Tabela 1 - *Pseudomonas aeruginosa* isolada do ambiente 71

Tabela 2 - *Micobacterium* não *tuberculosis* isolados do ambiente 71

Tabela 3 – Amostras clinicas de *Pseudomonas aeruginosa* 72

Tabela 4 - *Pseudomonas plecoglossicida* isoladas no ambiente 73

Tabela 5 - *Staphilococcus haemolyticus* isolados no ambiente 74

Tabela 6- *Staphylococcus hominis sub. esp. Novobiosepticus* isolados no ambiente 75

Tabela 7 - *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas do ambiente 76

Tabela 8 – Microrganismos ambientais isolados e não tipados 77

Tabela 9 – Teste de sensibilidade aos antibióticos da amostra HUC3 30 (P) 81

INDICE DE FIGURAS

Pag.

Figura 1-Etapas do processo de investigação 43

Figura 2- Florescência das colónias em meio PIA 47

Figura 3 – Colónias presuntivas de *Klebsiella spp* em meio MacConkey 48

Figura 4 - Aspeto das amostras presuntivamente Klebsiella quando inoculadas em meio KIA 49

Figura 5 – Colónias presuntivas de MNT em meio PANTA 50

Figura 6 - Ciclos de PCR no termociclador 52

Figura 7 – Imagem de PCR sob luz UV 52

Figura 8 – RAPD de *Pseudomonas aeruginosa* clinicas e ambiental 72

Figura 9 - RAPD de *Pseudomonas plecoglossicida* 74

Figura 10 - RAPD de *Staphilococcus haemolyticus* 75

Figura 11 - RAPD de *Staphilococcus hominis sub. esp. Novobiosepticus* 76

Figura 12 – RAPD *Stenotrophomonas maltophilia* 77

INDICE DE QUADROS

Pag.

Quadro 1 – Locais amostrados 45

Quadro 2- Compostos usados para PCR 51

Quadro 3 – Amostragem 1 no serviço A 59

Quadro 4 – Amostragem 1 no serviço B 60

Quadro 5 – Amostragem 1 no serviço C 61

Quadro 6 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 1ª amostragem 62

Quadro 7 - Equipamentos com contaminação alta na 1ª amostragem 62

Quadro 8 – Amostragem 2 no serviço A 63

Quadro 9 – Amostragem 2 no serviço B 64

Quadro 10 – Amostragem 2 no serviço C 65

Quadro 11 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 2ª amostragem 65

Quadro 12 - Equipamentos com contaminação alta na 2ª amostragem 66

Quadro 13 – Amostragem 3 no serviço A 67

Quadro 14 – Amostragem 3 no serviço B 68

Quadro 15 – Amostragem 3 no serviço C 68

Quadro 16 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 3ª amostragem 69

Quadro 17 - Equipamentos com contaminação alta na 3ª amostragem 70

Quadro 18 – Amostras clinicas 79

Quadro 19 - Perfil de sensibilidade aos antibióticos das amostras clinicas 82

INDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1 – Isolados clínicos por serviço	80
Gráfico 2 – Isolados clínicos	80

SUMÁRIO

Pag.

INTRODUÇÃO 23

1- INFECÇÃO ASSOCIADA AOS CUIDADOS DE SAÚDE 27

2– MICRORGANISMOS EM ESTUDO 33

2.1- *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 33

2.2 - *MICOBACTERIUM* NÃO-*TUBERCULOSIS* 36

2.3 - KLEBSIELLA spp. 37

2.4- GENE QUE CODIFICA O rRNA 16S 38

2.5- O MÉTODO DE TIPAGEM POR RAPD 39

3 – MATERIAIS E MÉTODOS 41

3.1 - TIPO DE ESTUDO 41

3.2 - OBJETIVOS E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO 41

3.3 - ETAPAS DO PROCESSO DE INVESTIGAÇÃO 43

3.4 - RECOLHA DE AMOSTRAS CLÍNICAS 44

3.5 - RECOLHA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS 44

3.5.1 - Amostragem 44

3.5.2 - Pesquisa, condições de crescimento e isolamento 46

3.5.3 - Preservação das amostras ambientais 50

3.5.4 - Determinação do número total de microrganismos e avaliação da contaminação ambiental 50

3.5.5 - Preservação dos isolados 50

3.6 - IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS 51

3.6.1 - Identificação dos isolados por sequenciação de gene que codifica o rRNA 16S 51

3.6.2 - Tipagem por RAPD 53

3.6.3 - Determinação do perfil de sensibilidade a antibióticos dos isolados clínicos e ambientais 53
3.7 – MEIOS DE CULTURA E DE PRESERVAÇÃO UTILIZADOS 54
3.8- MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESULTADOS 56
3.9 - PROCEDIMENTOS FORMAIS E ÉTICOS 57
4 - RESULTADOS 59
4.1 – RESULTADOS DA 1ª AMOSTRAGEM 59
4.1.1 - Grau de contaminação 61
4.1.2 - Equipamentos com contaminação alta 62
4.2 – RESULTADOS DA 2ª AMOSTRAGEM 63
4.2.1 - Grau de contaminação 65
4.2.2 - Equipamentos com contaminação alta 66
4.3 – RESULTADOS DA 3ª AMOSTRAGEM 66
4.3.1 - Grau de contaminação 69
4.3.2 – Equipamentos com contaminação alta 69
4.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS 70
4.4.1 – Isolados ambientais 70
4.4.2 – Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* 71
4.4.3 - RAPD das *Pseudomonas aeruginosa* (ambiental e clinicas) 72
4.5 – ISOLADOS DE OUTROS GRUPOS TAXONÓMICOS NOS MEIOS SELETIVOS PIA E MACCONKEY E RESPETIVO RAPD 73
4.6 – OUTRAS ESPÉCIES ISOLADAS NO AMBIENTE COM MENOR FREQUÊNCIA 77
4.7 – ISOLADOS CLÍNICOS 78
4.8 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS 81
4.8.1 – Ambientais 81
4.8.2 - Clínicas 82
5 - DISCUSSÃO 83
CONCLUSÕES 93

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

ANEXOS

ANEXO I – Protocolo de extração de DNA

ANEXO II - Autorização do Conselho de Administração do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

ANEXO III – Autorização dos Diretores dos Serviços

ANEXO IV – Autorização da Unidade de Investigação e Desenvolvimento e da Comissão de Ética

INTRODUÇÃO

Um estudo de investigação visa o aprofundamento teórico-prático do conhecimento existente numa determinada área do saber, tendo em vista, o aumento desse mesmo conhecimento, procurando dar resposta às inquietações com as quais o investigador se confronta. Fortin (2006) salienta o papel na investigação ao considerar que é através dela que se constitui um domínio de conhecimentos numa dada disciplina, sendo ao mesmo tempo um meio de demonstrar campo de ação e de conhecimento de uma profissão.

Na perspetiva de Polit, Beck e Hungler (2004), o desenvolvimento do conhecimento é essencial para a melhoria contínua dos cuidados prestados, esperando-se que cada vez mais os enfermeiros adotem uma prática baseada na evidência, usando resultados da pesquisa para fundamentar as suas decisões, ações e interações com os doentes.

Nos últimos anos, a produção de conhecimento tem tido um crescimento bastante acelerado, fazendo com que as práticas clínicas assentem numa base de evidência, conseguindo-se assim, uma melhoria contínua dos cuidados prestados e consequentemente um maior valor social da enfermagem. Contudo, este valor atribuído aos cuidados de enfermagem pode ainda ser maior, devendo para tal os enfermeiros fazer um contínuo esforço de demonstração dos ganhos em saúde com a sua atividade.

A prevenção das infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) é um aspeto fulcral na obtenção dos ganhos anteriormente referidos, sendo mesmo um indicador da qualidade dos cuidados prestados. A diminuição do número de IACS conduz a um menor gasto em antibioterapia, menor tempo de internamento, consequentemente menores custos associados aos cuidados prestados, sendo este um aspeto muito atual numa altura de escassos recursos. Isto deve não só preocupar os enfermeiros mas também toda a equipa multidisciplinar que lida com o doente. Contudo, os enfermeiros aqui têm um papel muito importante, pois estão permanentemente com o doente e são talvez os profissionais que mais facilmente evitam ou contribuem para o aparecimento de algumas IACS.

Neste contexto os enfermeiros em geral e os enfermeiros especialistas em enfermagem Médico-Cirurgica em particular, possuem um papel preponderante na prevenção e no controlo das IACS, na medida em que têm responsabilidades formativas e supervisivas sobre os restantes elementos da equipa, mas também porque assumem um papel de

coordenador dos cuidados e ao mesmo tempo supervisionam um trabalho que não sendo tarefa sua, está à sua responsabilidade. Trata-se da supervisão do trabalho dos assistentes operacionais, pois são estes que realizam a limpeza e desinfeção das superfícies e materiais de uso clínico de acordo com as normas preconizadas, sendo este o alvo de interesse deste estudo. Estes aspetos vêm ao encontro das competências definidas para o Enfermeiro especialista em Enfermagem em Pessoa em Situação Crítica.

Sabe-se do conhecimento geral que um meio ambiente húmido, associado a temperaturas adequadas, na presença de antibióticos e uma deficiente ou inadequada higienização das superfícies podem levar ao desenvolvimento de microrganismos multirresistentes em ambiente hospitalar.

Importa pois determinar quais os microrganismos multirresistentes presentes no ambiente hospitalar num determinado período de tempo e perceber se essas estirpes estão também presentes nas culturas de espécimes dos doentes internados nessa mesma unidade de saúde, no mesmo período de tempo. Para tal importa determinar a sua prevalência com vista à adoção de medidas retificativas. Filho e Rouquayrol (2006,p.133), definem prevalência como sendo um "termo descritivo da força com que subsistem as doenças nas coletividades". Segundo os mesmos autores, trata-se de um indicador de morbilidade, constituindo uma medida que permite comparar no tempo e no espaço, a ocorrência de uma dada doença em relação a variáveis referentes à população.

O presente estudo de investigação surge inserido no âmbito de uma parceria entre o Instituto Piaget do Algarve e a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC) tendo como meta a transferência de saberes entre a Universidade de Coimbra e o Instituto Piaget do Algarve e no qual este trabalho se insere.

Pretende-se com este trabalho, utilizando como objeto de estudo o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), em Coimbra, determinar o grau de contaminação ambiental e a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), Klebsiella spp* e *Micobacterium* não *tuberculosis* (MNT) e a sua variabilidade genética em doentes internados neste hospital e também no ambiente hospitalar.

Qualquer que seja o estudo de investigação deve ter sempre subjacentes princípios éticos, que segundo Polit, Beck e Hungler (2004), passam pelo princípio da beneficência, que encerra em si a máxima de que acima de tudo, não deve causar dano. Segundo os mesmos autores, este princípio encerra várias dimensões, sendo elas: a integridade, a garantia contra a exploração e a relação risco/beneficio.

Assim, este estudo permite ao CHUC obter os dados necessários à avaliação de alguns riscos específicos relacionados com *P. aeruginosa, Klebsilla* e MNT e integra-se nas necessidades reconhecidas de controlo e prevenção de infeções hospitalares.

Não é objetivo deste estudo fazer comparação entre serviços, mas sim poder encontrar pontos onde é necessário melhorar, contribuindo desta forma para prevenir as IACS e os custos sociais e económicos que delas advêm. O estudo terá então um impacto social (saúde pública) e económico positivo, e terá benefícios científicos e técnicos.

Este documento encontra-se estruturado de acordo com as linhas orientadoras para a elaboração de um relatório de investigação. Inicia-se por uma breve reflexão sobre a problemática das IACS em Portugal e no mundo, seguido-se uma fundamentação tórica sobre os microrganismos em estudo. Posteriormente é feita uma abordagem aos objetivos do estudo e respetivas questões de investigação, inseridas na descrição pormenorizada da metodologia adotada.

No capítulo seguinte são apresentados os resultados, seguido-se a sua discussão e uma breve conclusão.

1- INFECÇÃO ASSOCIADA AOS CUIDADOS DE SAÚDE

Não sendo uma preocupação recente, pois já Florence Nightingale teve essa preocupação na guerra da Crimeia, ao melhorar as condições sanitárias dos soldados feridos com consequente diminuição da taxa de mortalidade, ela torna-se mais pertinente nos dias de hoje, em que os recursos económicos são mais escassos e em que existe uma maior consciência dos direitos e deveres de cada um enquanto cidadão. Portugal, consciente deste problema elaborou um Plano Nacional de Controlo das Infeções associadas aos cuidados de saúde (PNCI) que está já sendo posto em prática e com alguns resultados.

As IACS são um problema cada vez mais atual não só nas sociedades mais desenvolvidas mas também nos países em vias de desenvolvimento, sendo a taxa de infeção hospitalar indicador de qualidade dos cuidados prestados e as IACS na maioria das vezes associadas a más práticas, com consequências sociais e económicas para as instituições, assim como para a sociedade em geral.

Trata-se de um problema relevante para as instituições de saúde, merecendo uma crescente atenção com o intuito de minimizar a sua ocorrência e consequente morbilidade e mortalidade humana associada.

Da infeção resulta sempre ou quase sempre um aumento do tempo de internamento com os custos que daí advêm, não só pelo internamento em si, também pelos custos com antibioterapia e outros medicamentos, bem como exames complementares de diagnóstico. Num estudo realizado na Bélgica (Pirson *et al.*,2005) em que foram analisados os casos de doentes que adquiriram bacteriemia em contexto hospitalar, verificou-se que a média de custo de internamento era de 18280 euros ao passo que os custos associados ao mesmo tipo de doentes que não tinham adquirido infeção eram de 5440 euros. Paralelamente a taxa de mortalidade nestes doentes foi de 36%, enquanto que foi de 6% em doentes com a mesma patologia de base mas sem bacteriemia.

Quando existe referência aos custos dos cuidados, pensa-se frequentemente em custos diretos, mas os custos indiretos como as perdas salariais da pessoa que acompanha o doente ou as perdas salariais de um doente profissionalmente ativo, são custos que importa também contabilizar e que representam 33,24 % dos custos totais (Gaspar *et al.,*2010).

Sousa *et al.* (2011), referem que esta problemática se insere nas questões relacionadas com a segurança do doente, ao ser parte integrante dos eventos adversos que podem ocorrer em contexto das práticas clínicas. Num estudo realizado em três hospitais públicos da região de Lisboa e depois de selecionados dezoito critérios de positividade para a ocorrência de eventos adversos, os autores verificaram que as IACS surgiram na 4.ª posição, com uma percentagem de 11%, sendo que dos 1669 processos analisados, 365, ou seja 21,9 % tinha sido vítima de pelo menos um evento adverso.

Alguns dos fatores que promovem a disseminação das bactérias nos hospitais podem dever-se a: uma deficiente higiene das mãos; transferência de doentes entre hospitais com a importação de estirpes multirresistentes; repetidas transferências de doentes colonizados e/ou infetados entre o hospital e os lares de acolhimento; transferência das estirpes ambientais para os doentes. Sobre este aspeto o Inquérito Nacional de Prevalência de Infeção de 2009 refere que da percentagem de doentes com IACS, 61% provinha do domicílio seguindo-se de outro serviço do hospital, com 23,8%, outro hospital com 8,1%, outra unidade com 3,4% e lares de idosos com 2,9% (Portugal, 2009).

Importa sensibilizar os profissionais para este problema, promovendo a adesão a normas de prevenção das IACS. Para tal torna-se necessário demonstrar através de estudos, que em muitos doentes infetados ou colonizados com bactérias multirresistentes, tal se deve à falta de cumprimento de normas, justificado pela sua existência no ambiente hospitalar.

A *P. aeruginosa e klebsiella spp* têm estado relacionadas com várias infeções nosocomiais, particularmente em unidades de cuidados intensivos, queimados e em doentes com fibrose quística e imunodeprimidos (Murray *et al*., 2006). Estas bactérias são frequentemente encontradas em ambientes húmidos, incluindo instalações hospitalares. No caso do género *Klebsiella* podem fazer parte da flora intestinal da maioria dos animais incluindo o ser humano, podendo facilmente colonizar doentes com diferentes patologias. Por outro lado, as MNT encontram-se dispersas no ambiente e ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* podem apresentar patogenicidade variável (*idem*).

A capacidade infeciosa das MNT está documentada em muitos estudos publicados, tendo a sua importância aumentado progressivamente nos últimos anos com o isolamento de diferentes espécies em ambientes aquáticos, incluindo águas naturais, águas residuais, ambientes aquáticos recreativos, águas industriais e águas hospitalares. Muitas MNT colonizam e são causa de infeções e surtos em ambiente hospitalar (Rendon *et al*.,2012).

A descoberta dos antibióticos e o seu uso cada vez mais abusivo, faz com que as bactérias vão ganhando progressivamente maiores resistências a estes agentes antimicrobianos.

As IACS surgem assim segundo o PNCI (2007, p.5), como um "conceito alargado de infeção adquirida pelos doentes e profissionais, associada à prestação de cuidados, onde quer que estes sejam prestados, independentemente do nível dos cuidados (agudos, reabilitação, ambulatório, domiciliários) ".

Para Nasser e Al-Mousa (2007), o termo infeção hospitalar, frequentemente aplicado como sinónimo de infeção nosocomial, caracteriza, de um modo sucinto, as infeções adquiridas numa instituição hospitalar tanto, pelos seus doentes (internados ou em tratamento ambulatório) como pelos profissionais da saúde que nela laboram (infeções ocupacionais ou acidentes de trabalho).

Não sendo um problema novo, como já foi referenciado, assume cada vez maior importância em Portugal e no mundo. O aumento da esperança de vida e o desenvolvimento tecnológico a que temos assistido, leva à utilização de técnicas cada vez mais avançadas e invasivas e de maior número de doentes em terapêutica imunossupressora, aumentando concomitantemente o risco de infeção.

Por estas razões, as unidades de cuidados intensivos são aquelas que na literatura são referenciadas como tendo uma grande percentagem de IACS. Segundo Lima (2007), na génese da sua ocorrência estão vários fatores, importando salientar, o uso prévio de antibióticos, alcoolismo, tabagismo, cirurgia, neutralização da acidez gástrica e doenças graves, como fatores de risco para colonização da orofaringe por bactérias gram negativas, podendo atingir 60% dos doentes críticos. Por conseguinte quanto maior o nível de colonização da orofaringe, maior o risco de desenvolver pneumonias hospitalares, risco este que advém de fatores que favorecem a microaspiração como por exemplo a diminuição do reflexo da tosse e da deglutição, lentificação do esvaziamento gástrico e a inoculação direta de microrganismos pelo uso de mecanismos de assistência ventilatória.

Assim, os estados têm procurado dar resposta a esta problemática através da criação de mecanismos de controlo e prevenção das IACS**.** Portugal através do seu ministério da saúde elaborou o PNCI, que é uma estratégia nacional na prevenção e combate a esta problemática através da vigilância epidemiológica, elaboração e divulgação de normas de boas práticas clínicas entre outras ações, cabendo às comissões de controlo da infeção (CCI) em cada instituição fazer a sua operacionalização (Portugal,2007). Lima (2007,p.29), reforça esta ideia ao afirmar que "esta comissão executa a vigilância contínua das incidências das infeções hospitalares e, quando necessário, recomenda

alterações nas normas e nos procedimentos e atualiza a instituição quanto às recomendações propostas para o controle das infeções hospitalares".

O PNCI preconiza o envolvimento de todos os profissionais que trabalham nas unidades de saúde e tem como medida de intervenção, "Colaborar na definição de políticas de utilização de antissépticos, desinfetantes e esterilização nas unidades de saúde como forma de padronizar procedimentos e melhorar a qualidade dos cuidados" (Portugal,2007,p.7).

Dentro das áreas de intervenção do PNCI encontram-se as recomendações de boas práticas em prevenção e controlo da infeção a nível das unidades de saúde e que deve incluir entre outros aspetos a:

-descontaminação de materiais e equipamentos;

-higiene ambiental;

-higiene e segurança alimentar;

-triagem, transporte e acondicionamento de roupas e resíduos;

-desinfeção;

-transporte de doentes;

-circuito de articulação funcional entre as unidades de saúde.

A seleção destes itens teve a ver com a relação que apresentam com os objetivos do estudo, pois contribuem para a manutenção de um ambiente hospitalar limpo e seguro tanto para o doente como para os profissionais que lá exercem a sua atividade.

Lima (2007) refere que os serviços, através de normas imanadas institucionalmente, devem dispor de rotinas quanto à técnica e utilização de desinfetantes. Para isso torna-se importante classificar o ambiente quanto ao seu potencial de contaminação, tendo a noção de que existem zonas críticas e semicríticas, e que cada uma delas terá um tipo de limpeza e desinfeção através de material adequado de acordo com as suas características distintas.

Segundo a mesma autora são consideradas zonas críticas, aquelas onde há maior número de doentes graves e procedimentos invasivos, dando como exemplo as unidades de cuidados intensivos, bloco cirúrgico ou serviço de diálise. Considera ainda como áreas semicríticas, todos os sectores onde se encontram doentes internados, mas com risco de infeção menor como as enfermarias, instalações sanitárias, etc.

Outros aspetos muito importantes a salientar são o correto armazenamento e transporte dos lixos e a existência de um circuito de limpos e sujos, bem definido em que não haja cruzamento de ambos.

A roupa dos doentes deve ser também objeto de acondicionamento e transporte até à lavandaria de forma adequada. Os próprios colchões das camas são meio de desenvolvimento de microrganismos multirresistentes. Segundo Lima (2007,p.69) “foram descritos dois surtos de infeção hospitalar em unidades de queimados relacionadas com colchões húmidos colonizados por *Acinetobacter calcoaceticus* e *P. aeruginosa”,* o que prova a necessidade de uma correta lavagem, desinfeção e secagem adequada dos equipamentos e superfícies para não ser favorecedora do desenvolvimento de flora microbiana.

2– MICRORGANISMOS EM ESTUDO

Neste capítulo são apresentados alguns conceitos relativos aos microrganismos que irão ser estudados, assim como às técnicas utilizadas para a sua identificação tanto ao nível da espécie como ao nível da estirpe.

2.1- *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Trata-se de uma bactéria frequentemente encontrada em ambientes húmidos, incluindo instalações hospitalares podendo facilmente colonizar doentes com diferentes patologias.

De acordo com o Inquérito Nacional de Prevalência de Infeção de 2009, realizado em Portugal no mesmo ano e num universo de 114 hospitais públicos e privados, verificou-se que paralelamente com o *Staphilococcus aureus* meticilina resistente e a *Escherichia coli*, a *P. aeruginosa* foi uma das espécies mais frequentemente encontradas (Portugal, 2009).

Nalgumas instituições hospitalares portuguesas tem sido uma das bactérias mais frequentemente encontradas nas culturas de espécimes realizadas aos doentes internados. Segundo o Relatório de Prevalência (2010) dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) do CHUC, esta foi a 4ª bactéria mais frequentemente isolada nesse ano, tendo passado para a 3ª no inquérito de prevalência no ano de 2012, na mesma instituição.

Segundo Abegg e Silva (2011) num estudo realizado em 2008 numa unidade de cuidados intensivos da cidade de Toledo, no Paraná, Brasil, verificou-se que dos 12 doentes que apresentavam culturas positivas, 30,77% tratava-se de infeções por *P. aeruginosa*. O mesmo estudo refere que as infeções causadas por esta espécie de bactéria são geralmente de origem hospitalar. Sendo que, e fazendo ainda referência ao mesmo estudo, durante as ultimas quatro décadas, a incidência por *P. aeruginosa* foi responsável por 10% das infeções nosocomiais.

Murray *et al.* (2004) referem que se trata de bacilos gram-negativos encontrados no solo, em matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. Sendo que também se encontram facilmente em ambiente hospitalar em reservatórios húmidos,

alimentos, flores, pias, equipamentos sanitários, materiais para limpeza de chão, equipamentos de tratamentos, sobretudo respiratório, e até mesmo em soluções desinfetantes. Caetano *et al (*2011), salientam que num estudo realizado num hospital brasileiro de Fortaleza, 68% dos doseadores de sabão líquido encontravam-se contaminados, sendo *P. aeruginosa* a 2ª bactéria mais frequentemente isolada.

Estudos realizados no Hospital de Faro (HF) em Faro, entre 2010 e 2011 que ainda não se encontram publicados na forma de artigo mas já disponibilizados em poster e que fazem parte do projeto de investigação onde este se insere, mostraram 18% das amostras ambientais positivas para a presença de *P. aeruginosa* (Abreu *et, al*., 2011).

.

Murray *et al.* (2004) salientam a pouca exigência nutritiva para o seu crescimento e desenvolvimento. Muitos compostos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogénio, contudo algumas estirpes podem crescer em água destilada utilizando quantidades mínimas de nutrientes.

A capacidade de isolar estes microrganismos ambientais das superfícies húmidas segundo Murray *et al.* (2004) pode apenas estar limitada á sua procura, pois para além das fracas exigências nutricionais, toleram também temperaturas que vão dos 4 aos 42 °C, sendo também resistentes a muitos antibióticos e desinfetantes.

Para Caetano *et al.* (2011), estas bactérias possuem vários fatores estruturais e toxinas que as tornam resistentes à maioria dos antibióticos comummente utilizados estimulando o seu potencial patogénico.

Vários estudos têm demonstrado que *P. aeruginosa* está relacionada com várias infeções nosocomiais, particularmente em unidades de cuidados intensivos, queimados e pacientes com fibrose quística. No caso de doentes portadores de fibrose quística, estudos têm demonstrado que com o avançar da idade destes doentes a *P. aeruginosa* torna-se o agente mais comum, sendo isolado em mais de 90%dos casos (Gamboa 2006).

Segundo Vosahlikova *et al.* (2007) inicialmente considerava-se que cada doente era portador de uma estirpe e que dificilmente a transmitia a outro, hoje estudos comprovam que a mesma estirpe se transmite aos vários doentes. A mesma autora refere que num estudo realizado na República Checa, num centro com doentes portadores de fibrose quística verificou-se que uma vasta percentagem se encontrava infetada por esta bactéria. O estudo comprovou que dos 69 doentes, que representavam 80% dos doentes do referido hospital, identificaram-se 44 estirpes diferentes e 9 grupos de 2 a 5 estirpes. O mesmo estudo salienta ainda tratarem-se de estirpes sensíveis a um vasto

leque de antibióticos. Em conclusão o estudo mostra a grande variabilidade genética das estirpes de P. *aeruginosa,* mas no entanto, com boa susceptibilidade a agentes antipseudomonas.

A colonização inicial por esta bactéria nos doentes portadores de fibrose quística faz-se por estirpes não mucoides, que se tornam mucoides ao segregarem uma substancia (alginato) envolvente e protetora das colónias contra as defesas normais do organismo e contra a ação dos antibióticos (Gamboa, 2006).

Para Murray *et al.* (2004) essa capa de alginato é uma cápsula polissacaridea que possui múltiplas funções: ancóra as bactérias às células epiteliais ao mesmo tempo que as protege da fagocitose e da atividade dos antibióticos, como os aminoglicosídios. Segundo os mesmos autores a resistência aos antibióticos deve-se a vários mecanismos, sendo a mutação das proteínas porinas o principal mecanismo de resistência, pois a penetração dos antibióticos na célula das Pseudomonas dá-se principalmente através dos poros da membrana externa. Se as proteínas que formam a parede desses poros são alteradas para limitar o fluxo através dos canais, pode surgir a resistência a muitas classes de antibióticos.

Considerando que as Pseudomonas não possuem exigências nutricionais, como já foi referenciado, a sua cultura torna-se fácil em meios comuns como o Agar sendo necessária a incubação aeróbia de modo que o crescimento em caldo fique confinado à interface caldo-ar. Cresce rapidamente e forma colónias planas de borda espalhada, com pigmentação verde causada pela produção de piocianina azul e de fluorescência amarela, e um odor caracteristicamente doce, semelhante ao de uva (Murray *et al.,* 2004).

Ainda que nas pesquisas realizadas, as infeções por Pseudomonas estejam muito associadas a doentes com fibrose quística sob a forma de infeções pulmonares, elas podem surgir noutros órgãos e sobretudo afetar doentes imuno-deprimidos. Segundo Murray *et al.* (2004) a *P. aeruginosa* pode estar na origem de infeções da pele, sendo as mais comuns as infeções de queimaduras, as folicolites podem também surgir na sequência da imersão em águas contaminadas podendo ainda infetar áreas da pele com acne. Podem ainda atingir e provocar infeções no trato urinário, ouvidos, olhos, podendo levar ao desenvolvimento de úlceras da córnea e à cegueira, bacteriemia e endocardite.

Para Murray *et al.* (2004), em ambiente hospitalar as práticas devem ir no sentido de combater a infeção, devendo estar concentradas na prevenção da contaminação dos equipamentos estéreis, como os utilizados no caso de tratamento respiratório ou em diálise, bem como na contaminação cruzada entre a equipa de saúde e o doente.

2.2 - *MICOBACTERIUM* NÃO-*TUBERCULOSIS*

Murray *et al.* (2004) referem que o género é constituído por bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos. A parede celular é rica em lipídos, tornando a sua superfície hidrofóbica, facilitando a resistência a numerosos desinfetantes, a antibióticos, bem como a corantes usados em laboratório. Devido ao facto da parede destes bacilos ser complexa, a maioria das bactérias cresce lentamente (ex. *Micobacterium avium* e *Micobacterium kansaii*) dividindo-se a cada 12 a 24 horas. Assim o seu isolamento pode levar de 3 a 8 semanas. Há ainda dentro deste género um grupo considerado de crescimento mais rápido (ex. *Micobacterium fortuitum e Micobacterium abscessus)* que necessitam de um período de incubação de 3 dias ou mais, mas normalmente com um crescimento em menos de 7 dias.

As MNT encontram-se dispersas no ambiente e, ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, podem apresentar patogenicidade variável. A sua importância aumentou progressivamente nos últimos anos com isolamentos de diferentes espécies em ambientes aquáticos, incluindo águas naturais, águas residuais, ambientes aquáticos recreativos, águas industriais e águas hospitalares.

Segundo Vijayaraghavan *et al.* (2006), num estudo realizado na Índia em que se identificaram 145 casos de infeções em doentes submetidos a cirurgia por laparoscopia, em 35 desses casos tratava-se de infeção por *Mycobacterium chlonae.* A fonte de contaminação foi identificada, como sendo a água usada para lavar os instrumentos após a desinfeção química. O microrganismo sobrevivia e crescia dentro do biofilme, na parte inferior de tabuleiros, de desinfetantes e dentro das mangas exteriores reutilizáveis dos laparoscópios. Para controlo desta problemática foram introduzidas medidas corretivas que incluíram a mudança para a esterilização com óxido de etileno, sendo previamente feita a desmontagem, lavagem manual e secagem dos instrumentos e equipamentos em vez de esterilização química. Nos três anos seguintes não se verificaram mais episódios *Micobacterium* atípicos.

Sendo que muitas MNT colonizam e são causa de infeções e surtos em ambiente hospitalar, Vijayaraghavan *et al* (2006) lembram que importa ter consciência de que se trata de um microrganismo omnipresente e oportunista que não é facilmente erradicado do ambiente hospitalar, uma vigilância cuidadosa e uma atenção detalhada aos métodos de desinfeção de dispositivos médicos e o uso apropriado de medidas de controlo, são essenciais para prevenir possíveis surtos.

Para Murray *et al*. (2004), no Homem, o MNT é responsável por várias patologias sobretudo do foro respiratório, podendo provocar doenças parecidas com tuberculose, mas que pode infetar outros órgãos ou tecidos. Outra patologia comum sobretudo nos países menos desenvolvidos é a lepra, provocada pelo *Micobacterium leprae.* Estima-se que mais de 6 milhões de casos de lepra são reconhecidos mundialmente sobretudo em África e Ásia.

Murray *et al*. (2004) referem ainda que o espectro das doenças causadas pelo *Micobacterium* pode continuar a expandir-se sobretudo devido a doenças como a SIDA, doenças malignas e transplantação de órgãos, que associada à utilização de terapêutica imunossupressora, criam uma população cada vez mais suscetivel.

Não é tarefa simples o crescimento *in vitro* das Micobactérias, uma vez que as bactérias de crescimento mais rápido crescem limitando o seu crescimento. Para colmatar esta lacuna Murray *et al.* (2004) salientam que têm sido desenvolvidos meios de cultura que permitem o crescimento rápido da maioria das bactérias. Dessa maneira o tempo médio de crescimento diminuiu de 3 a 4 semanas para 10 a 14 dias.

2.3 - KLEBSIELLA spp.

O género *Klebsiella*, faz parte da família *Enterobacteriaceae* e constitui o maior e mais heterogéneo conjunto de bastonetes Gram negativos clinicamente importantes. Encontram-se no solo, na água e vegetação e fazem parte da flora intestinal da maioria dos animais, incluindo o ser humano. Apresentam necessidades nutricionais simples, possuem a capacidade de fermentar glicose, reduzem nitrato e são catálase-positivas e oxidase-negativas, sendo que, dentro das *Enterobacteriaceae,* o género *Klebsiella* tem ainda a capacidade de fermentar lactose (Murray *et al.*, 2006).

Raramente estão associadas com infeções, contudo tornam-se oportunistas, infetando doentes imunodeprimidos (Mims *et al.*, 1999). Os mesmos autores salientam que a infeção pode ser endógena ou adquirida por contacto e que o género em causa possui uma capacidade marcada de sobrevivência nas mãos.

O género "apresenta uma capsula proeminente que é responsável pela aparência mucoide das colonias isoladas e pela alta virulência dos organismos *in vivo."* (Murray *et al.,* 2006, p.327).

As espécies mais comumente isoladas são *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, podendo estas ser responsáveis por situações de pneumonia, sendo que a pneumonia causada por estas espécies de *Klebsiella* pode, com alguma frequência provocar

necrose dos alvéolos, levando à formação de cavidades e produção de muco sanguinolento. São ainda causa de infeções do trato urinário, feridas e tecidos moles (Murray *et al.,* 2006).

Ao longo dos anos as várias espécies de *Klebsiella* têm sido objeto de estudo a nível hospitalar, não só pelo aumento da sua frequência mas também pelo aumento do perfil de resistência aos antibióticos. Num estudo realizado num hospital brasileiro ao longo de 10 anos (de 1999 a 2008) foi possível concluir que a frequência de isolamento de *Klebsiella spp* foi de 13,4%, com uma maior predominância em uroculturas (54,4%). Paralelamente foi-se evidenciando um aumento da resistência aos antibióticos testados, que com exceção para a cefoxitina e o imipenem, justificados pelo facto de não ser rotineiramente utilizada no tratamento de infeções por *Klebsiella spp,* no que se refere o primeiro e pelo uso de outro antibiótico da mesma família o ertapenem em detrimento do segundo (Oliveira *et al*.,2011).

Tal como *P. aeruginosa*, nalgumas instituições hospitalares portuguesas, tem sido uma das bactérias mais frequentemente encontradas nas culturas de espécimes realizadas aos doentes internados. No inquérito nacional de prevalência das IACS de 2009, a *Klebsiella pneumoniae* foi responsável por 125 casos de infeção, correspondendo a 7,9% (Portugal,2010). Em 2010, foram notificados 502 casos de infeção provocados por *Enterobacteriaceae,* 128 deles pertencentes ao género *Klebsiella* (não sendo feita referência às diferentes espécies), ocupando o 6º lugar dos microrganismos mais frequentemente isolados no conjunto das 97 instituições hospitalares que participaram no estudo (Portugal,2010). Nos HUC, e tomando como referência o inquérito de prevalência de infeção de 2012, o género *Klebsiella pneum*oniae, foi a 4ª bactéria mais frequentemente encontrada (CCI/HUC, 2012).

2.4- GENE QUE CODIFICA O rRNA 16S

Trata-se de um gene que codifica para o RNA (Ácido Ribonucleico) estrutural que faz parte da subunidade mais pequena do ribossoma 70S, presente em todas as bactérias. Apresenta características conservadas ao longo do processo de evolução e pode ser um indicador de como os microrganismos estão relacionados entre si do ponto de vista filogenético permitindo ao mesmo tempo diferenciar os organismos de diferentes espécies.

Segundo Gomes (1998), a sequenciação do gene que codifica o rRNA 16S, permite proceder à elaboração de árvores filogenéticas onde se podem colocar vários grupos

evolutivos de bactérias próximas e observar as suas relações de ancestralidade. Quando a sequência do gene de rRNA 16S de várias estirpes apresenta valores superiores a 95% são considerados como membros da mesma espécie.

No entanto, as regras aceites para a descrição de novas espécies microbianas dizem que estirpes que difiram em mais de 97% ao nível da sequência do gene do rRNA 16S e que simultaneamente, a percentagem de hibridação DNA-DNA (Ácido Desoxirribonucleico) com a espécie mais próxima seja menor que 70% e os testes bioquímicos sejam diferenciativos, constituem novas espécies.

2.5- O MÉTODO DE TIPAGEM POR RAPD

Alves *et al.* (2003) referem que a tipagem de microrganismos é o método que permite discriminar os indivíduos dentro da mesma espécie ou grupo, dependendo da técnica utilizada. O método de tipagem por RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA)* baseia-se, tal como o nome indica, na análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA amplificados aleatoriamente. Discrimina dentro da mesma espécie. É rápido, económico mas tem como fator negativo depender o perfil obtido dos materiais utilizados como sejam o termociclador.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão abordados os objetivos da investigação, as questões formuladas, bem como todas as estratégias e meios que foram utilizados para dar resposta às questões formuladas.

3.1 - TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo-correlacional. Segundo Fortin (2006,p.244), este tipo de estudo "tem por objetivo explorar relações entre variáveis e descrevê-las", salientando ainda que muitas vezes o investigador pode estar na presença de variáveis, de que ignora quais podem estar associadas entre si. A autora refere ainda que neste tipo de investigação são as questões que guiam o estudo e não as hipóteses, não fazendo portanto sentido a existência de variáveis dependentes e independentes.

3.2 - OBJETIVOS E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO

Para Fortin (2006,p.160), "o enunciado do objetivo de investigação deve indicar de forma clara e límpida qual é o fim que o investigador persegue. Ele especifica as variáveis chave, a população junto da qual serão recolhidos os dados e o verbo de ação que serve para orientar a investigação".

Os objetivos traçados para esta investigação foram:

1-Avaliar a presença de estirpes patogénicas oportunistas de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT, em material e locais hospitalares.

2-Relacionar a presença de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT com o nível de contaminação microbiológica dos materiais da unidade hospitalar.

3-Determinar o perfil de resistência/multiresistência a antibióticos e relacionar com a persistência da (s) estirpe (s) na unidade hospitalar, no ambiente, ou em material clínico.

4-Relacionar a estrutura clonal das estirpes encontradas no hospital e das estirpes encontradas nos doentes.

Para Fortin (2006, p.164) as questões de investigação são mais específicas que os objetivos "e incluem os diferentes aspetos suscetiveis de serem estudados. As questões decorrem diretamente do objetivo e indicam o que o investigador quer obter como informação". Assim foram definidas as seguintes questões de investigação:

Relativamente ao primeiro objetivo;

-Existem estirpes de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT no ambiente hospitalar?

-Onde se encontram as estirpes de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT no ambiente hospitalar?

-Qual a prevalência de estirpes patogénicas oportunistas de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT, em material e ambiente hospitalares?

Relativamente ao segundo objetivo;

-Qual o grau de contaminação microbiana nos materiais e ambiente hospitalares?

-Qual a relação entre a presença de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT e o nível de contaminação microbiológica dos materiais da unidade hospitalar?

Relativamente ao terceiro objetivo;

-As estirpes de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT isoladas são resistentes a antibióticos?

-As estirpes de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT são resistentes ao mesmo grupo de antibióticos?

-Existe diferença entre o perfil de resistência a antibióticos entre as estripes clínicas e ambientais?

-Qual a relação entre o perfil de resistência/multiresistência a antibióticos e a persistência da (s) estirpe (s) na unidade hospitalar?

Relativamente ao quarto objetivo;

-As estirpes da mesma espécie isoladas no ambiente têm origem clonal?

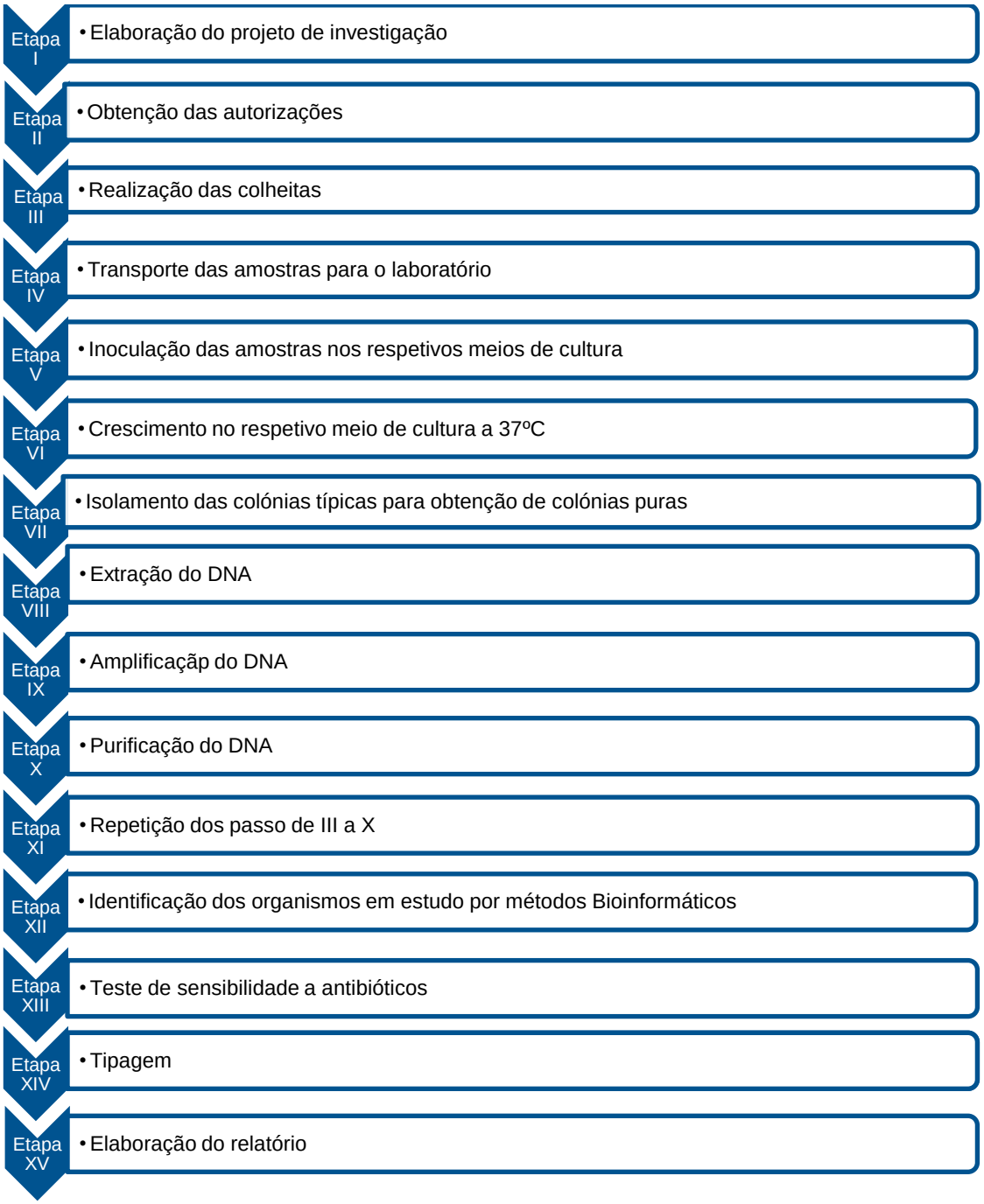
-As estirpes da mesma espécie com origem clínica têm origem clonal?

-Existe relação clonal entre as estirpes encontradas no ambiente hospitalar e as estirpes encontradas nos doentes?

3.3 - ETAPAS DO PROCESSO DE INVESTIGAÇÃO

Para que o processo de recolha das amostras e seu tratamento fosse possível foram realizadas várias etapas que se sistematizam na figura seguinte:

Figura 1 – Etapas do processo de investigação



3.4 - RECOLHA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Semanalmente o laboratório de microbiologia dos CHUC, cedeu aos investigadores do Laboratório de Microbiologia da FCTUC, as amostras clínicas das estirpes em estudo isoladas em doentes internados nos serviços objeto da recolha das amostras ambientais, bem como o respetivo perfil de sensibilidade a antibióticos, para poderem ser cultivadas, purificadas e criopreservadas no Laboratório de Microbiologia da FCTUC para posterior genotipagem.

Todo o material biológico recolhido nos CHUC foi transportado, em condições adequadas para o Laboratório de Microbiologia da FCTUC, de acordo com as recomendações para o transporte de substâncias com risco biológico (*United Nations*, 2003) e criopreservadas, em caixa sinalizada adequadamente.

3.5 - RECOLHA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

A seleção dos serviços amostrados foi de acordo com sugestão da CCI do hospital objeto do estudo. Manteve-se toda a metodologia inicialmente prevista e que seguidamente se descreve de forma pormenorizada.

3.5.1 - Amostragem

Foram realizadas três colheitas com intervalos mensais, em novembro e dezembro de 2012 e janeiro de 2013. Todas as colheitas tiveram início cerca das 10 horas e terminaram cerca das 13 horas, mantendo-se assim as mesmas condições no que diz respeito à utilização e higienização de superfícies, materiais e equipamentos.

Em cada amostragem realizada, foram feitas em média 56 colheitas, distribuídas pelos serviços A, B e C, mantendo-se os locais de amostragem sempre que possível como mostra o quadro 1. Dois dos serviços situam-se no 7º piso e um no 6º piso do hospital em estudo. As amostras foram realizadas através de zaragatoa, com recurso a um cotonete esterilizado e numa área de 10x10cm, sendo obtidas em zonas húmidas e em zonas secas, tal como se apresentam no quadro 1.

Quadro 1 – Locais amostrados

SERVIÇO	Nº DA AMOSTRA	LOCAIS AMOSTRADOS
A	1	Interruptor wc sala grande
	2	Torneira lavatório wc sala grande
	3	Ralo lavatório wc sala grande
	4	Chuveiro wc sala grande
	5	Cortinado wc sala grande
	6	Mesa de cabeceira
	7	Fundo da cama
	8	Pega suporte cabeceira da cama
	9	Carro de terapêutica
	10	Bancada sala de terapêutica
	11	Torneira sala de terapêutica
	12	Tabuleiro usado
	13	Tabuleiro limpo
	14	Interruptor wc quarto 3
	15	Torneira wc quarto 3
	16	Chuveiro wc quarto 3
	17	Puxador porta sala enfermagem
	18	Entrada da adufa
	19	Saída adufa
	20	Teclado código porta entrada
B	21	Torneira lavatório wc sala grande A
	22	Ralo lavatório wc sala grande A
	23	Chuveiro wc sala grande A
	24	Interruptor wc sala grande A
	25	Fundo da cama A
	26	Mesa de cabeceira A
	27	Carro de terapêutica
	28	Tabuleiro usado
	29	Bancada sala de terapêutica
	30	Torneira sala de terapêutica
	31	Tabuleiro limpo
	32	Teclado computador
	33	Arrecadação roupa limpa
	34	Fundo da cama B
	35	Mesa de cabeceira B
	36	Interruptor wc sala grande B
	37	Torneira lavatório wc sala grande B
	38	Chuveiro wc sala grande B
	39	Cortinado wc sala grande B
	40	Cortinado sala grande B
	41	Código entrada enfermaria
	42	Campainha entrada enfermaria
C	43	Carro de terapêutica
	44	Tabuleiro usado
	45	Torneira sala de terapêutica
	46	Bancada sala de terapêutica
	47	Interruptor wc sala grande
	48	Torneira wc sala grande
	49	Chuveiro wc sala grande
	50	Cortinado wc sala grande
	51	Fundo da cama
	52	Mesa de cabeceira
	53	Manipulo porta sala trabalho
	54	Tabuleiro limpo
	55	Pega suporte cabeceira da cama
	56	Comando cama

As zaragatoas foram transportadas em meio *peptone water* (ver cap. 3.6*),* até ao laboratório, nas condições atrás referidas, para posterior plaqueamento.

Para facilitar o trabalho prático e a organização dos resultados, todas as amostras foram codificadas de acordo com a amostragem, HUC1 para a 1ª amostragem, HUC2 para a 2ª amostragem e HUC3 para a 3ª amostragem, o local da colheita (apresentado no quadro 1), e o meio de cultura onde foram inoculadas, P para meio Pia, K para meio MacConkey e M para meio PANTA (exemplo: HUC1 3 (P) - 1ª amostragem, amostra colhida no ralo lavatório wc sala grande no serviço A, inoculada em meio PIA).

3.5.2 - Pesquisa, condições de crescimento e isolamento

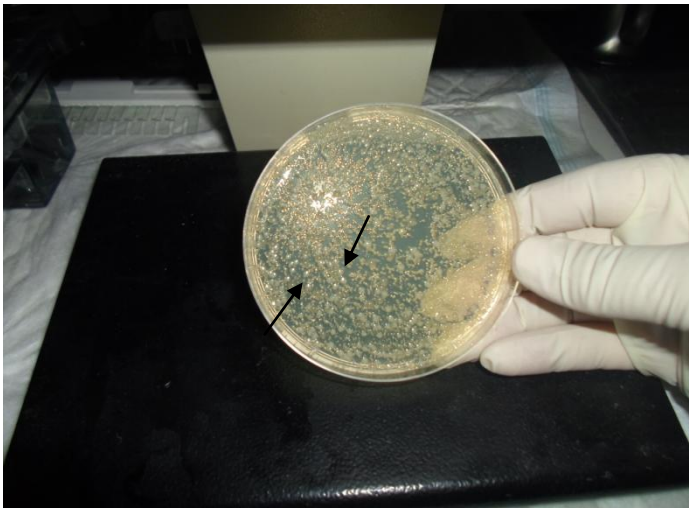
Foram utilizados diferentes meios de cultivo que teve por objetivo a recuperação de diferentes grupos bacterianos. Os meios selecionados são meios seletivos cuja composição química permite o crescimento dos grupos alvos e inibe o crescimento de outros grupos.

Pseudomonas

Para a deteção e isolamento de estirpes do género *Pseudomonas* do grupo fluorescente*,* todas as amostras foram inoculadas por espalhamento de 100 µl em meio PIA (Pseudomonas Isolation Agár) (ver cap.3.6).

Após incubação de 48 horas a uma temperatura de 37º C, as amostras foram avaliadas quanto à presença de fluorescência sob luz ultravioleta (UV). As colónias fluorescentes foram consideradas presuntivamente *Pseudomonas* e isoladas para posterior caracterização. As colónias presuntivas de *Pseudomonas* foram repicadas para caixas com meio R2A (ver cap.3.6) com a finalidade de obter colonias puras para posterior extração de DNA. As culturas quando puras foram criopreservadas a -80ºC. A figura 2 mostra a presença de fluorescência sob luz UV em colonias cultivadas em meio PIA.

Figura 2- Florescência das colónias em meio PIA

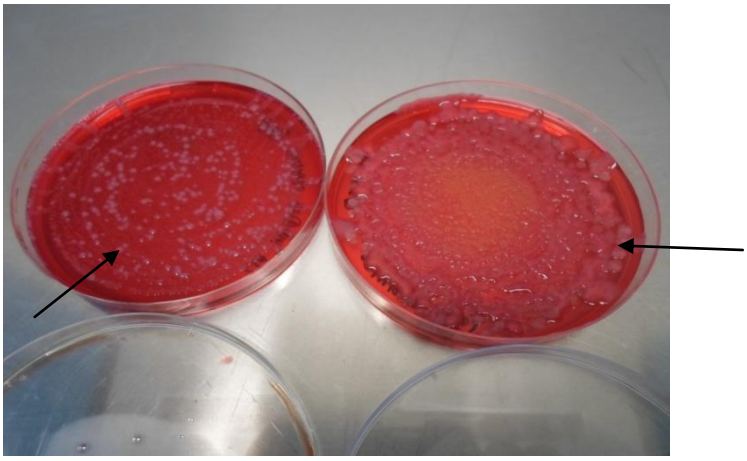


Klebsiella spp

As *Enterobacteriaceaes*, das quais as estirpes do género *Kebsiella* fazem parte, podem crescer de uma forma rápida, aeróbia ou anaerobiamente em diversos meios não seletivos como por exemplo, agár de sangue e em meios seletivos, como por exemplo, o meio MacConkey (Murray *et al.,* 2006). Neste sentido, para o isolamento de estirpes do género *Klebsiella,* todas as amostras foram inoculadas por espalhamento de 100 µl em meio MacConkey (ver cap.3.6) formulação sem cristal de violeta (MacFaddin, 1985; Portugal, 2004).

Após incubação de 48 horas à temperatura de 37ºC, as amostras foram avaliadas quanto à presença de colonias típicas. Foram consideradas presuntivamente *Klebsiella* as colónias que apresentaram como características: o aspeto viscoso, mucoide, de cor rosa escuro, com centro vermelho e contornos regulares (MacFaddin, 1985), como mostra a figura 3. Assim, as colónias presuntivas de *Klebsiella* foram repicadas para caixas com meio R2A (ver cap.3.6), com a finalidade de obter colonias puras para posterior extração de DNA que após sequenciação, permitiu identificar as espécies em estudo.

Figura 3 – Colónias presuntivas de *Klebsiella spp* em meio MacConkey



Uma vez que o número de colónias no meio MacConkey foi elevado, e que este permite o crescimento de outros grupos bacterianos, para além das *Enterobacteriaceae,* procedeu-se a uma primeira caracterização dos isolados em meio KIA (Kigler`s Iron Agár) (ver cap.3.6).

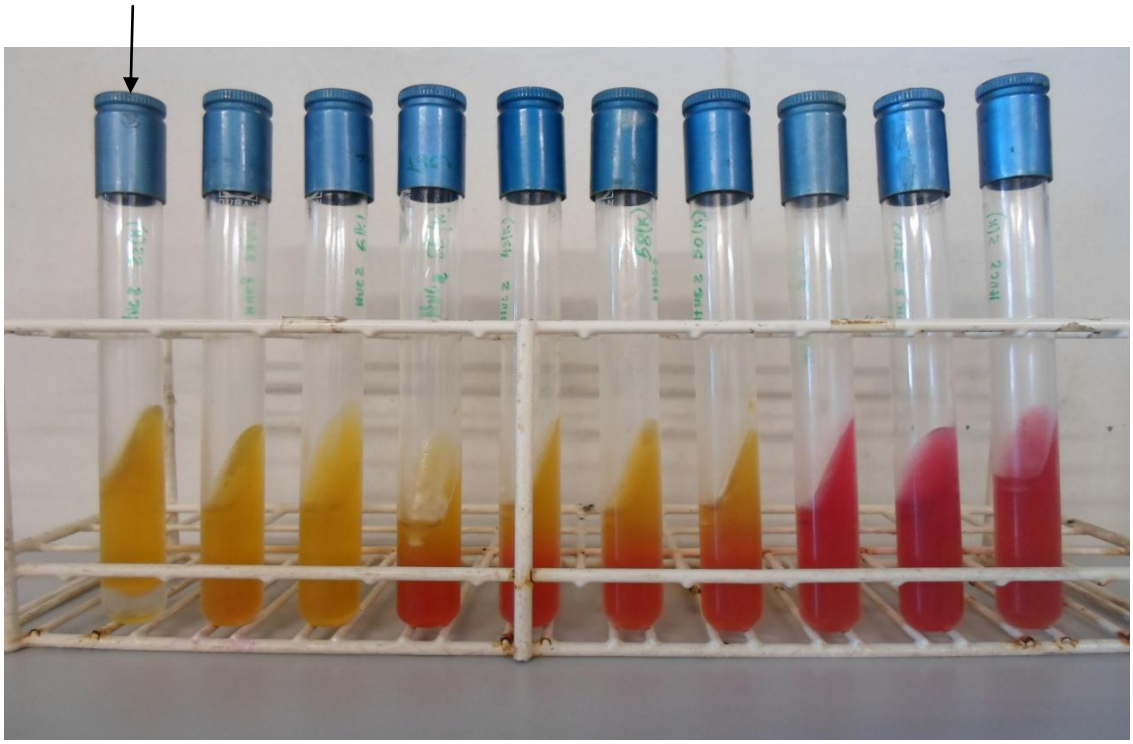
Como referido anteriormente as estirpes do género *Klebsiella* têm a capacidade de fermentar lactose e glucose e produzir gás (Murray *et al.*, 2006). Por isso, quando inoculadas em meio KIA os tubos de ensaio apresentam as seguintes características: fundo amarelo (produção de ácido a partir de lactose, em anaerobiose), superfície amarela (fermentação de glucose, em aerobiose). Para além destes aspetos, verifica-se a elevação do meio no tubo de ensaio, pela formação de gás no fundo deste (MacFaddin, 1985).

Segundo (MacFaddin, 1985), outros padrões de cores nos tubos com meio KIA podem ser encontrados, mas não indicam a presença de Klebsiella.

Assim, pelo menos 2 colonias de todos os tipos coloniais que cresceram em meio MacConkey foram consideradas presuntivamente do género *Klebsiella*, e foram inoculados em meio KIA. Após 18 horas de incubação, a uma temperatura de 37ºC, as amostras foram avaliadas quanto à presença das características referidas, como mostra a figura 4**.**

Após este processo, só foi feita extração de DNA das bactérias, cuja inoculação em meio KIA apresentou as características como mostra o tubo de ensaio identificado (1º à esquerda).

Figura 4 - Aspeto das amostras presuntivamente Klebsiella quando inoculadas em meio KIA



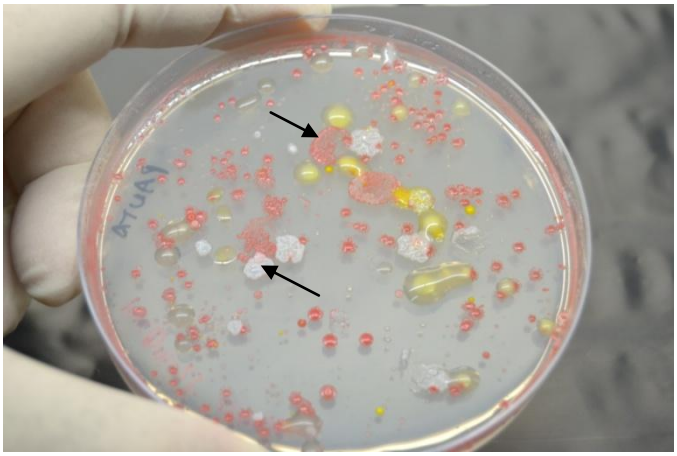
***Micobacterium* não tuberculosis**

Para a identificação do género MNT, todas as amostras foram inoculadas por espalhamento de 100 µl em meio Middlebrook 7H11j-PANTA, à frente designado apenas como PANTA (ver cap.3.6).

Após inoculação das amostras no referido meio, estas foram colocadas a uma temperatura de 37ºC, sendo avaliadas quanto à presença de colonias num período que mediou as 48 horas e as seis semanas, pois como foi referido, muitas espécies do género MNT, são de crescimento lento. As colónias com diferentes morfologias foram contadas em cada placa e purificadas em meio Löwenstein-Jensen incubado a 30°C para isolamento. Os isolados foram rastreados para detecção das micobactérias e de outros bacilos ácido-resistentes por coloração de Ziehl-Neelsen com um kit Quick-TB (Rutherford Appleton). Os bacilos ácido-resistentes foram posteriormente identificados por sequenciação parcial do gene rRNA 16S.

Foram consideradas presuntivamente MNT as colonias de aspeto mucoide, com superfície lisa ou rugosa e de aspeto seco ou húmido, e de cor variável (Wayne *et al*.,1986,cit.por Mota,2011) como mostra a figura 5.

Figura 5 – Colónias presuntivas de MNT em meio PANTA



3.5.3 - Preservação das amostras ambientais

Após realizada a inoculação nos meios de cultura descritos as amostras foram guardadas a 4ºC para posterior controlo.

3.5.4 - Determinação do número total de microrganismos e avaliação da contaminação ambiental

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao grau de contaminação considerando o número total de colónias nos diferentes meios. Assim, foram enumeradas todas as colónias presentes nas placas com meio PIA, MacConkey e PANTA. Foi utilizada a mesma metodologia do estudo efetuado no HF, já referenciado anteriormente (Abreu *et al*., 2011).

As amostras foram consideradas contendo um nível baixo de contaminação quando se observou um número de colónias inferior a 20. Foram consideradas com um nível médio de contaminação quando se observou um número de colónias entre 20 e 200. Foram consideradas com um nível alto de contaminação quando verificou a existência de um número de colónias superior a 200.

3.5.5 - Preservação dos isolados

Para um posterior controlo, todos os isolados foram preservados em tubos com meio adequado, designado por *LURIA BROTH* (LB) (ver cap.3.6) contendo 15% glicerol. Posteriormente, foram congeladas a -80ºC para eventual utilização futura.

3.6 - IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Todos os isolados presuntivamente identificados como pertencentes aos grupos microbianos do estudo, foram identificados por sequenciação de gene que codifica o rRNA 16S. As espécies que foram simultaneamente encontradas em diferentes locais ou em amostras clínicas e no ambiente foram tipadas por RAPD. Foi ainda determinado o perfil de sensibilidade aos antibióticos das estirpes da mesma espécie isoladas do ambiente e comparadas com as estirpes clínicas.

3.6.1 - Identificação dos isolados por sequenciação de gene que codifica o rRNA 16S

A sequência do gene que codifica o rRNA 16S foi usada para a identificação das estirpes presuntivas de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e MNT isoladas. As colónias cultivadas em meio PIA e em meio MacConkey foram resuspendidas em 100 µl lisozima TE e o seu DNA extraído por processo químico (Nielsen *et al., 1995*) apresentado em anexo (Anexo I). A extração do DNA dos isolados MNT foi feita no laboratório onde foram sequenciados. Os lizados foram preservados a -20ºC.

O DNA extraído foi utilizado para amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), adicionando-se à amostra os compostos e respetivas quantidades apresentados no quadro 2, para se obter um volume final de 30µl (Ben-Dov *et al*., 2006).

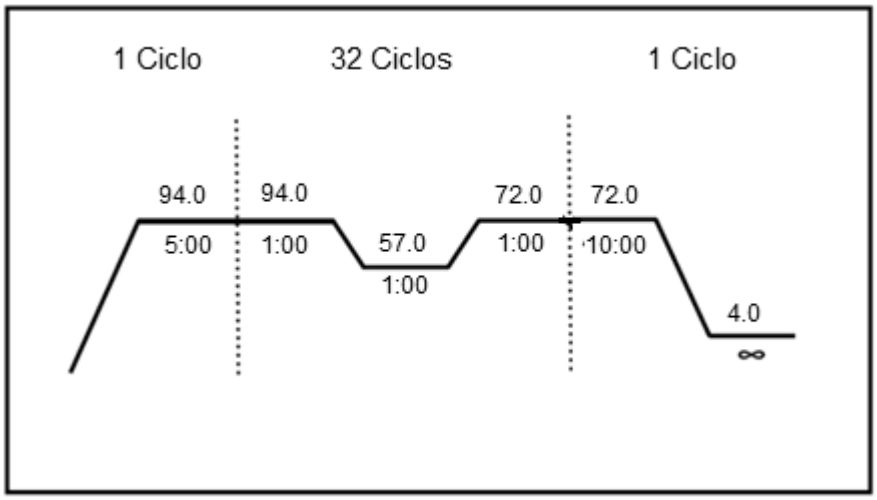
Quadro 2- Compostos usados para PCR

Compostos	Quantidades
Água estéril	19,1 µl
dNTP's (desoxinucleotidos trifosfatos)	6 µl
Buffer (Tampão)	3 µl
Primer	0,3 µl
Primrer R	0,3 µl
Taq DNA polimerase	0,3 µl
DNA da amostra	2 µl

Posteriormente as amostras foram colocadas num termociclador programado para os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação inicial de 1 ciclo, durante 5 minutos a uma temperatura de 94ºC, seguidos de 32 ciclos para desnaturação, composto cada, por um minuto a uma temperatura de 94ºC, seguindo-se um minuto a uma temperatura

de 57ºC e mais um minuto a 72ºC. Por fim, é feito um ciclo de dez minutos a 72ºC para assegurar a completa extensão dos produtos de PCR. Findo este processo a temperatura baixa a 4 ºC, para preservação das amostras (Figura 6).

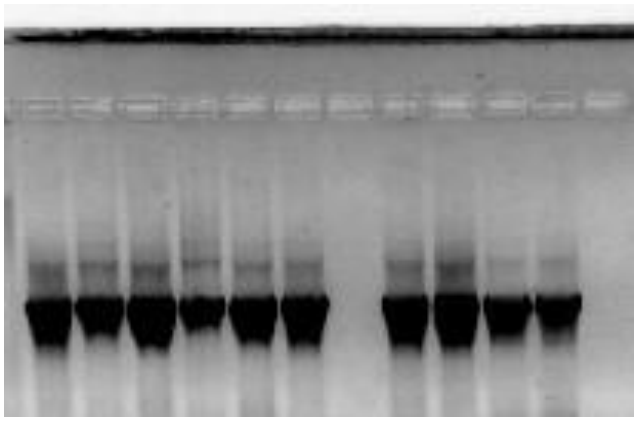
Figura 6 - Ciclos de PCR no termociclador



Para excluir uma possível contaminação, foi usado um controlo negativo, composto por toda a mistura atrás descrita, com exceção do DNA.

A visualização da amplificação do gene que codifica o rRNA 16S por PCR, realizou-se por eletroforese em gel de agarose a 1%, com brometo de etídio, durante aproximadamente 1 hora, sob uma corrente elétrica de 100V, em tampão de TAE, após adição de *"loading buffer"* à solução contendo o DNA como mostra a figura 7.

Figura 7 – Imagem de PCR sob luz UV



Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel com um kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen) e sequenciados (Morais *et al.,* 1997).

O DNA foi enviado para sequenciar (Macrogen®) e as sequencias obtidas foram avaliadas quando à sua pureza (não contaminação). Para identificação dos microrganismos, as sequências foram alinhadas e comparadas (BLAST) com as sequências presentes nas bases de dados EzBioclaud e do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.6.2 - Tipagem por RAPD

Todos os isolados identificados como: *P. aeruginosa*, *P.plecoglissicida, Staphylococcus homins, S. haemolytccus* e *Stenotrophomonas matophilia* foram tipados pelo método de RAPD. O método pressupõe a amplificação de segmentos do DNA ao acaso, por PCR, utilizando primers curtos (10 bases) e temperatura de ligação baixa. Os fragmentos amplificados foram analisados por electroforese em gel de agarose, e os padrões obtidos foram registados por software (BioRad) sob luz UV.

Foram testados vários primers para avaliar o que gerava maior discriminação, tendo sido então utilizado o OPA3 para comparação das estirpes. Esta metodologia tem sido utilizada pelo Laboratório de Microbiologia FCTUC para rastreamento de contaminações em empresas alimentares e também em hospitais (Morais *et al.,* 1997).

3.6.3 - Determinação do perfil de sensibilidade a antibióticos dos isolados clínicos e ambientais

No âmbito dos procedimentos clínicos, são efetuadas análises para diagnóstico. As amostras têm origem nos diversos serviços e são processadas no laboratório de microbiologia do hospital. Aí, as estirpes isoladas são caracterizadas através dos seus perfis bioquímicos, com recurso a sistemas automatizados. O perfil obtido permite a identificação das estirpes. As estirpes são depois caracterizadas quanto ao seu perfil de resistência a antibióticos também através do sistema automatizado. Para este trabalho o laboratório de microbiologia dos CHUC forneceu as estirpes dos grupos microbianos alvo isoladas em doentes internados nos serviços onde foram realizadas as amostragens ambientais. Forneceu ainda o perfil de sensibilidade aos antibióticos de cada estirpe para posterior tratamento de dados.

Paralelamente, no laboratório da FCTUC procedeu-se à determinação do perfil de resistência aos antibióticos das estirpes isoladas no ambiente para posterior comparação.

Para tal, procedeu-se à suspensão de uma ansa de material celular da estirpe em estudo num *eppendorf*® contendo 1 ml de Meio Mínimo (ver cap.3.6). Esta suspensão foi posteriormente inoculada, por espalhamento de 100 µl, em placa de Petri contendo meio Müller Hinter (ver cap.3.6), onde os antibióticos sob a forma de disco foram adicionados.

Após 24 horas de incubação a uma temperatura de 37ºC, e humidade controlada, as estirpes foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade aos antibióticos. Para tal, foi medido o diâmetro de inibição de crescimento bacteriano em torno do disco de antibiótico. Os diâmetros foram comparados com uma escala de antibiograma dos laboratórios bioMérieux® de acordo com a origem dos antibióticos utilizados no presente estudo.

3.7 – MEIOS DE CULTURA E DE PRESERVAÇÃO UTILIZADOS

Foram utilizados um conjunto de meios de cultura e preservação de que falaremos de seguida.

PEPTONE WATER

Obtida pela adição de 10 g de peptona e 5 g de cloreto de sódio num litro de água, (Neogen, 2010a).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min.

PIA

Constituído por, 20g de gelatina de enzimas digestivas, 1,4 g de cloreto de magnésio, 10 g de sulfato de potássio, 0,025 g de Irgasan® e 13,6 g de Agar, num litro de água (Neogen,2011b).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

MACCONKEY

Este meio é constituído por 17 g de gelatina peptona, 3,0 g de caseína/carne (50/50) peptona, 10 g de lactose, 5,0 g de cloreto de sódio, 5,0 g de mistura de sais biliares, 12 g de agar e 0,04 g de vermelho neutro num litro de água (MacFaddin, 1985).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

PANTA

O meio Middlebrook 7H11j, sólido preparado por adição de 10% (vol/vol) de ácido oleico-albumina-dextrose-catalase (OADC) (BectonDickinson), 0.5% (vol/vol) de glicerol, e 2 µg/ml mycobactin J (SynbioticsCorporation) ao meio Middlebrook 7H10 (Difco). O meio Middlebrook 7H11j-PANTA foi preparado pela adição de 2.0% (vol/vol) e de um suplemento de antibióticos (PANTA PLUS, BectonDickinson) para obter as seguintes concentrações finais de antibióticos no meio de cultura: 40 U/ml de polimixina, 4 µg/ml de anfotericina B, 16 µg/ml de ácido nalidixico, 4 µg/ml de trimetoprim, e 4 µg/ml de azlocilin (Radomski *et al*., 2010).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

R2A AGAR

É constituído por 0,25 gr de enzima digestiva caseína, 0,25 gr de enzima digestiva de tecido animal (proteose peptona), 0,5 gr de ácido hidrolisado de caseína, 0,5 gr de extrato de carne, 0,5 gr de glicose, 0,5 gr de amido solúvel, 0,3 gr de fosfato dipotássico, 0,05 gr de sulfato de magnésio, 0,3 gr de piruvato de sódio e 15 gr de agar para um litro de água (Neogen,2009).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

LB

Este meio é constituído pela adição de 10 gr. de Triptona, 5 gr de estrato de levedura e 5 gr de cloreto de sódio num litro de água (Neogen, 2010b).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min.

Kigler`s Iron Agar

Obtida pela adição de: 3,0 g de extrato de carne, 3,0 g de extrato de levedura, 15,0 g de peptona, 5,0 g de proteose peptona, 10,0 g de lactose, 1,0 g de glicose, 5,0 g de Cloreto

de sódio, 0,2 g de sulfato de ferro, 0,3 g de tiossulfato de sódio, 12,0 g de Agar e 0.024 g de vermelho de fenol em 1000ml de água (MacFaddin, 1985).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

MEIO MÍNIMO

Para a preparação de 100ml deste meio, adicionou-se 10 ml da solução de macronutrientes e 1 ml da solução de micronutrientes em 100ml de água.

A solução de macronutrientes é composta por ácido nitrilotracético, 1.0 g; Sulfato de cálcio dihidratado, 0.6 g; Sulfato de magnésio, 1.0 g; Cloreto de sódio, 0.8 g; nitrato de potássio, 1.03 g; nitrato de sódio, 6.89 g; fosfato de sódio, 1.11 g, num litro de água (Tiago,2006).

A solução de micronutrientes é composta por sulfato de magnésio, 0.22 g; sulfato de zinco, 0.05 g; ácido bórico, 0.05 g; sulfato de cobre, 0.0025 g; molibidato de sódio, 0.0025 g; cloreto de cobalto, 0.0046 g, num litro de água (*idem*).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min.

MULLER HINTER AGAR

É composto por 2 g de extrato de carne, 17,5 g de hidrolisado de caseína ácida, 1,5 g de amido e 17 g de Agar num litro de água (Neogen,2011a).

O meio, para utilização, foi previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min., arrefecido a 50ºC e distribuído em Caixa de Petri.

3.8- MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESULTADOS

A análise dos padrões electroforéticos foi feita com recurso a *software* de imagem. Foi utilizada análise estatística multivariada (Canoco V.4.0, CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlands) para o reconhecimento das relações entre as estirpes, com base nos dados moleculares e de sensibilidade a antibióticos. O método de análise dos resultados foi feito com recurso a contagens numéricas absolutas e percentuais.

3.9 - PROCEDIMENTOS FORMAIS E ÉTICOS

Para que o desenvolvimento deste trabalho de investigação fosse possível, foi solicitado pela FCTUC ao Conselho de Administração (CA) do CHUC, a respetiva autorização para a realização das atividades de pesquisa e divulgação dos resultados (anexo II). Assim foi dada a respetiva autorização após parecer favorável dos diretores dos serviços alvo do estudo (anexo III) e da Unidade de Investigação e Desenvolvimento e da Comissão de Ética do referido hospital (anexo IV). Os pedidos foram efetuados em nome da Professora Paula Morais, responsável do projeto.

4 - RESULTADOS

Apresentam-se de seguida os resultados da avaliação do número de microrganismos em cada amostra recolhida em cada uma das três amostragens e referente a cada um dos meios de cultura utilizados.

4.1 – RESULTADOS DA 1ª AMOSTRAGEM

A primeira amostragem foi realizada a 8 de novembro de 2012. No serviço A, como mostra o quadro 3**,** as amostras com o maior número de colónias provieram de torneiras, chuveiros e de um ralo de lavatório. O número elevado de microrganismos nestas amostras foi independente do meio de cultura usado, com exceção de uma amostra de torneira que não apresentou colónias em meio MacConkey e outra que não apresentou em meio PANTA e de uma amostra de interruptor de um quarto que em meio PANTA apresentou um número incontável de colónias.

Num número considerável de amostras não se observaram colónias nos meios de isolamento (quadro 3). Duas das amostras continham fungos que foram isolados em meio PANTA. Amostras provenientes de ambientes com água ou húmidos continham maior número de microrganismos com capacidade de crescer nos meios PIA e MacConkey, enquanto no meio PANTA foram recuperados microrganismos de amostras recolhidas tanto de ambientes húmidos como de ambientes secos.

Quadro 3 – Amostragem 1 no serviço A

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
A	Interruptor wc sala grande	0	0	Fungo
	Torneira lavatório wc sala grande	incont.	0	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	0	0
	Mesa de cabeceira	0	0	24
	Fundo da cama	0	0	9
	Pega suporte cabeceira da cama	0	0	0
	Carro de terapêutica	0	0	13
	Bancada sala de terapêutica	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	incont.	incont.	incont.
	Tabuleiro usado	15	0	0

	Tabuleiro limpo	0	0	13
	Interruptor wc quarto 3	0	0	incont.
	Torneira wc quarto 3	303	incont.	0
	Chuveiro wc quarto 3	incont.	incont.	incont.
	Puxador porta sala enfermagem	0	0	0
	Entrada da adufa	0	0	11
	Saída adufa	0	0	23
	Teclado código porta entrada	0	0	Fungo

No serviço B, como mostra o quadro 4, as amostras de torneiras, chuveiros, fundo de cama A, mesa de cabeceira A, arrecadação de roupa limpa e campainha entrada enfermaria, foram as que apresentaram maior número de colónias. Foi detetado um fungo na amostra do tabuleiro limpo em meio PANTA.

O meio PANTA, apresentou maior número de colónias, comparativamente com os outros meios de isolamento, num maior número de amostras.

Quadro 4 – Amostragem 1 no serviço B

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
B	Torneira lavatório wc sala grande A	3	0	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande A	13	0	30
	Chuveiro wc sala grande A	0	incont.	incont.
	Interruptor wc sala grande A	0	0	1
	Fundo da cama A	incont.	0	incont.
	Mesa de cabeceira A	0	0	incont.
	Carro de terapêutica	0	0	69
	Tabuleiro usado	0	22	0
	Bancada sala de terapêutica	0	0	2
	Torneira sala de terapêutica	incont.	2	incont.
	Tabuleiro limpo	0	0	Fungo
	Teclado computador sala de terapêutica	0	0	148
	Arrecadação roupa limpa	0	0	incont.
	Fundo da cama B	0	0	71
	Mesa de cabeceira B	0	0	0
	Interruptor wc sala grande B	0	0	3
	Torneira wc sala grande B	incont.	0	incont.
	Chuveiro wc sala grande B	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande B	0	0	0
	Cortinado sala grande B	0	48	101
	Código entrada enfermaria	0	0	0
	Campainha entrada enfermaria	0	0	incont.

No serviço C, como mostra a quadro 5, as amostras de torneiras e chuveiros foram as que apresentaram maior número de colónias. Do total de amostras deste serviço algumas continham um número elevado de microrganismos, quando detetados nos meios PIA e MacConkey, e outras amostras não continham organismos recuperáveis nestes meios. Quando a pesquisa foi feita em meio PANTA só não foram encontrados microrganismos nas amostras retiradas no carro da terapêutica, tabuleiro usado e bancada da sala de terapêutica.

Quadro 5 – Amostragem 1 no serviço C

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
C	Carro de terapêutica	0	0	0
	Tabuleiro usado	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	incont.	0	incont.
	Bancada sala de terapêutica	0	0	0
	Interruptor wc sala grande	0	0	12
	Torneira wc sala grande	0	Incont.	incont.
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	0	4
	Fundo da cama	0	0	65
	Mesa de cabeceira	0	11	84
	Manipulo porta sala trabalho	0	0	74
	Tabuleiro limpo	0	5	130
	Pega suporte cabeceira da cama	0	17	112
	Comando cama	0	0	3

4.1.1 - Grau de contaminação

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao grau de contaminação avaliado nos 3 meios. Os 3 meios de cultura são seletivos recuperando diferentes grupos de microrganismos.

O quadro 6 mostra a distribuição das amostras de acordo com o número de colónias detetado em cada um dos meios. O número de amostras em cada classe foi semelhante nos meios PIA e MacConkey. Quando se utilizou meio PANTA detetou-se um maior número de microrganismos nas amostras.

Quadro 6 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 1ª amostragem

Meio / Grau de cont.	PIA	MacConkey	PANTA
Baixa (< 20)	44	45	26
Média (20 - 200)	0	2	12
Alta (> 200)	12	9	18

4.1.2 - Equipamentos com contaminação alta

O quadro 7 discrimina os equipamentos com grau de contaminação alta distribuídos pelos diferentes serviços, considerando os três meios de cultura utilizados. As torneiras e os chuveiros foram os equipamentos com maior nível de contaminação em todos os meios de cultura. Nas amostras provenientes de locais secos apenas se observou um nível de contaminação alto em meio PANTA com exceção para o fundo de uma cama, no serviço B. Todas as amostras colhidas em torneiras e em chuveiros apresentaram um grau de contaminação alto em pelo menos um dos meios utilizados.

Quadro 7 - Equipamentos com contaminação alta na 1ª amostragem

SERVIÇO / LOCAL	A			B			C			TOTAL
	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			
	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	
Torneira	3	2	2	2	0	3	1	1	2	16
Ralo lavatório	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
Chuveiro wc	2	2	2	1	2	2	1	1	1	14
Fundo de cama	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
Campainha	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Interruptor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Mesa de cabeceira	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Arrecadação roupa limpa	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

4.2 – RESULTADOS DA 2ª AMOSTRAGEM

Neste subcapítulo analisam-se os resultados da 2ª amostragem realizada a 7 de dezembro de 2012.

No serviço A, como mostra o quadro 8, as amostras com um maior número de colónias provieram de novo de torneiras, ralo do lavatório e chuveiros. Nos meios PIA e PANTA, o número de colónias recuperado foi zero ou incontável, com exceção do puxador porta sala enfermagem que em meio PANTA recuperou duas colónias. Em meio MacConkey, o número de colónias recuperadas variou de zero até incontáveis.

Relativamente à entrada e saída da adufa, não se observaram colonias nas amostras em nenhum dos meios de isolamento utilizados (quadro 8). Importa no entanto referir que na 1ª amostragem foi feita zaragatoa do chão, nesta foi feita nas paredes laterais.

Na amostra recolhida na mesa-de-cabeceira foi detetado ainda um fungo em meio PIA (quadro 8).

Quadro 8 – Amostragem 2 no serviço A

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
A	Interruptor wc sala grande	0	0	0
	Torneira lavatório wc sala grande	incont.	30	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	0	0
	Mesa de cabeceira	fungo	7	0
	Fundo da cama	0	2	0
	Pega suporte cabeceira da cama	0	43	0
	Carro de terapêutica	0	0	0
	Bancada sala de terapêutica	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	incont.	incont.	incont.
	Tabuleiro usado	0	0	0
	Tabuleiro limpo	0	0	0
	Interruptor wc quarto 3	0	0	0
	Torneira wc quarto 3	incont.	incont.	incont.
	Chuveiro wc quarto 3	incont.	79	incont.
	Puxador porta sala enfermagem	0	2	2
	Entrada da adufa	0	0	0
	Saída adufa	0	0	0
	Teclado código porta entrada	0	0	0

No serviço B, como mostra o quadro 9, as amostras de torneiras, ralo do lavatório e chuveiros foram as que apresentaram um maior número de colónias. Importa salientar o facto de nesta amostragem, o chuveiro do wc da sala grande A ter sido substituído, apresentando nesta amostragem um nível de contaminação baixo.

Nesta amostragem o número de colónias recuperadas em todos os meios utilizados ou foi muito elevada (incontável) ou baixa.

Quadro 9 – Amostragem 2 no serviço B

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
B	Torneira lavatório wc sala grande A	incont.	0	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande A	incont.	Incont.	incont.
	Chuveiro wc sala grande A	2	13	9
	Interruptor wc sala grande A	0	0	3
	Fundo da cama A	0	11	1
	Mesa de cabeceira A	0	2	0
	Carro de terapêutica	0	3	0
	Tabuleiro usado	0	0	0
	Bancada sala de terapêutica	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	incont.	incont.	incont.
	Tabuleiro limpo	0	0	0
	Teclado computador sala de terapêutica	0	0	0
	Arrecadação roupa limpa	0	0	0
	Fundo da cama B	0	0	0
	Mesa de cabeceira B	0	0	0
	Interruptor wc sala grande B	0	0	0
	Torneira wc sala grande B	incont.	0	incont.
	Chuveiro wc sala grande B	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande B	0	0	0
	Cortinado sala grande B	0	0	0
	Código da entrada enfermaria	0	0	0
	Campainha entrada enfermaria	0	5	5

No serviço C como mostra o quadro 10, as amostras de uma torneira e um chuveiro são as que apresentaram um maior número de colónias. Num número considerável de amostras não se observaram colónias nos meios utilizados.

Foi detetado um fungo na amostra colhida no cortinado do wc da sala grande em meio PANTA.

Nesta amostragem foi ainda feita uma zaragatoa num candeeiro de cabeceira de cama, não estando inicialmente planeado, que revelou um nível de contaminação baixo em todos os meios utilizados como se pode observar pela análise do quadro 10**.**

Quadro 10 – Amostragem 2 no serviço C

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
C	Carro de terapêutica	0	1	5
	Tabuleiro usado	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	incont.	0	incont.
	Bancada sala de terapêutica	2	0	0
	Interruptor wc sala grande	0	3	2
	Torneira wc sala grande	0	0	6
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	1	2 + 1 fungo
	Fundo da cama	0	0	0
	Mesa de cabeceira	0	8	0
	Manipulo porta sala trabalho	0	0	0
	Tabuleiro limpo	0	0	0
	Pega suporte cabeceira da cama	0	8	0
	Comando cama	0	0	0
	Candeeiro cabeceira de cama	0	9	14

4.2.1 - Grau de contaminação

Todas as amostras, tal como na amostragem anterior, foram avaliadas quanto ao grau de contaminação nos três meios utilizados, utilizando as classes anteriormente definidas.

O quadro 11 mostra a distribuição das amostras de acordo com o número de colónias detetado em cada um dos meios. O número de amostras nas três classes foi igual nos meios PIA e PANTA. Em meio MacConkey verificou-se a existência de um menor número de amostras com contaminação alta e a existência de amostras na classe intermédia.

Quadro 11 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 2ª amostragem

Meio / Grau de cont.	PIA	MACCONKEY	PANTA
Baixo (< 20)	44	46	44
Médio (20 - 200)	0	3	0
Alto (> 200)	13	8	13

4.2.2 - Equipamentos com contaminação alta

O quadro 12 discrimina os equipamentos com grau de contaminação alta distribuídos pelos diferentes serviços, considerando os três meios de cultura utilizados. Os chuveiros, as torneiras e os ralos dos lavatórios foram os equipamentos com um maior nível de contaminação em todos os meios de cultura utilizados. Registando-se assim um grau de contaminação alto apenas em amostras provenientes de locais húmidos.

Quadro 12 - Equipamentos com contaminação alta na 2ª amostragem

SERVIÇO / LOCAL	A			B			C			TOTAL
	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			
	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	
Torneira	3	2	3	3	1	3	1	0	1	17
Ralo lavatório	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6
Chuveiro	2	1	2	1	1	1	1	1	1	11

4.3 – RESULTADOS DA 3ª AMOSTRAGEM

Neste subcapítulo analisam-se os resultados da 3ª amostragem realizada a 14 de janeiro de 2013.

No serviço A, como mostra o quadro 13, as amostras com um maior número de colónias provieram de torneiras, chuveiros e ralo do lavatório. O número de microrganismos nestas amostras foi semelhante em meio PIA e em meio PANTA. Em meio MacConkey, apenas três amostras (uma torneira e dois chuveiros) apresentaram um número de microrganismos incontáveis.

O número de colónias recuperado em cada um dos meios variou desde zero até incontáveis, como se pode observar no quadro 13.

Quadro 13 – Amostragem 3 no serviço A

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
A	Interruptor wc sala grande	17	0	50
	Torneira lavatório wc sala grande	182	0	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande	incont.	72	incont.
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	0	0
	Mesa de cabeceira	0	0	15
	Fundo da cama	0	0	80
	Pega suporte cabeceira da cama	0	70	66
	Carro de terapêutica	0	0	0
	Bancada sala de terapêutica	0	0	2
	Torneira sala de terapêutica	incont.	incont.	incont.
	Tabuleiro usado	0	1	9
	Tabuleiro limpo	0	11	8
	Interruptor wc quarto 3	0	0	0
	Torneira wc quarto 3	316	0	incont.
	Chuveiro wc quarto 3	incont.	incont.	incont.
	Puxador porta sala enfermagem	0	2	0
	Entrada da adufa	0	0	5
	Saída adufa	0	1	0
	Teclado código porta entrada	0	0	0

No serviço B, como mostra o quadro 14, as amostras de torneiras e dos chuveiros foram as que apresentaram um maior número de colónias em todos os meios de cultura utlizados, com exceção para a torneira do lavatório do wc da sala grande A que só apresenta um número de colonias incontáveis em meio PANTA e a torneira do wc da sala grande B que em meio MacConkey não apresentou colónias. Na amostra proveniente do teclado computador sala de terapêutica foi isolado um fungo em meio PANTA.

O número de microrganismos recuperados em meio PIA e MacConkey foi ou muito elevado (incontável) ou muito baixo. Em PANTA o número de colónias recuperadas variou desde zero até incontáveis (quadro 14).

Quadro 14 – Amostragem 3 no serviço B

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
B	Torneira lavatório wc sala grande A	0	11	incont.
	Ralo lavatório wc sala grande A	11	0	108
	Chuveiro wc sala grande A	0	0	44
	Interruptor wc sala grande A	0	5	1
	Fundo da cama A	0	1	1
	Mesa de cabeceira A	0	17	9
	Caro de terapêutica	0	0	0
	Tabuleiro usado	0	0	4
	Bancada sala de terapêutica	0	0	6
	Torneira sala de terapêutica	incont.	incont.	incont.
	Tabuleiro limpo	0	0	0
	Teclado computador sala de terapêutica	0	0	fungo
	Arrecadação roupa limpa	0	0	0
	Fundo da cama B	0	0	162
	Mesa de cabeceira B	0	0	1
	Interruptor wc sala grande B	0	0	3
	Torneira wc sala grande B	incont.	0	incont.
	Chuveiro wc sala grande B	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande B	0	0	0
	Cortinado sala grande B	0	0	0
	Código entrada enfermaria	0	0	0

No serviço C, como mostra o quadro 15, as amostras que provieram das torneiras e dos chuveiros foram as que apresentaram um maior número de colónias.

O número de colónias recuperadas em meio PIA foi ou muito elevado (incontável) ou muito baixo. Em PANTA e MacConkey o número de colónias recuperadas variou desde zero até incontáveis (quadro 15).

Nesta amostragem, o candeeiro de cabeceira da cama amostrado, foi diferente do anterior. Na amostra proveniente deste candeeiro foi possível recuperar microrganismos nos meios MacConkey e PANTA (quadro 15).

Quadro 15 – Amostragem 3 no serviço C

SERVIÇO	LOCAIS	PIA	MacConkey	PANTA
C	Carro de terapêutica	0	4	0
	Tabuleiro usado	0	0	0
	Torneira sala de terapêutica	0	incont.	incont.
	Bancada sala de terapêutica	0	0	0
	Interruptor wc sala grande	0	0	8

	Torneira wc sala grande	285	0	incont.
	Chuveiro wc sala grande	incont.	incont.	incont.
	Cortinado wc sala grande	0	1	1
	Fundo da cama	0	11	1
	Mesa de cabeceira	0	222	81
	Manipulo porta sala trabalho	10	12	8
	Tabuleiro limpo	ne	ne	ne
	Pega suporte cabeceira da cama	0	61	36
	Comando cama	0	1	3
	Candeeiro cabeceira de cama	0	59	38

ne – não efetuada

4.3.1 - Grau de contaminação

Como nas amostragens anteriores, todas as amostras, foram avaliadas quanto ao grau de contaminação nos 3 meios utilizados, utilizando as classes anteriormente definidas.

O quadro 16 mostra a distribuição das amostras de acordo com o número de colónias detetadas em cada um dos meios. Nos meios PIA e MacConkey, o número de amostras na classe baixo, foi semelhante, verificando-se diferenças, ainda que não muito significativas nas outras duas classes. Quando utilizado o meio PANTA, detetou-se um maior número de microrganismos nas amostras, verifica-se uma maior dispersão de pelas três classes.

Quadro 16 – Número de amostras de acordo com o grau de contaminação e o meio de cultura utilizado na 3ª amostragem

Meio / Grau de cont.	PIA	MACCONKEY	PANTA
Baixo (< 20)	44	43	33
Médio (20 - 200)	1	4	9
Alto (> 200)	10	8	13

4.3.2 – Equipamentos com contaminação alta

O quadro 17 discrimina os equipamentos com grau de contaminação alta distribuídos pelos diferentes serviços, considerando os três meios de cultura utilizados. As torneiras e os chuveiros foram os equipamentos com maior nível de contaminação em todos os meios de cultura utilizados. O ralo do lavatório no serviço A, apresentou também um nível de contaminação alto nos meios PIA e PANTA.

Apenas foram identificados níveis de contaminação alta em amostras provenientes de locais húmidos com exceção de uma mesa de cabeceira (quadro 17).

Quadro17 - Equipamentos com contaminação alta na 3ª amostragem

SERVIÇO / LOCAL	A			B			C			TOTAL
	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			
	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	Pia	Mac-Conkey	Panta	
Torneira	2	1	3	2	1	3	1	1	2	16
Ralo lavatório	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Chuveiro wc	2	2	2	1	1	1	1	1	1	12
Mesa de cabeceira	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

4.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS

Como referido anteriormente, todas as colonias presuntivas de tratarem-se de bactérias objeto do estudo foram isoladas, o seu DNA extraído e o gene que codifica o rRNA16S sequenciado, para posterior identificação dos microrganismos em estudo, utilizando as bases de dados EZBiocloud e NCBI.

4.4.1 – Isolados ambientais

Pseudomonas aeruginosa

A sequência do gene que codifica o rRNA 16S do isolado número 75 da amostra Huc3 30p apresentou 99,91 % de semelhança com a sequência da estirpe tipo da espécie P. aeruginosa (*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 T) e, como tal, foi identificada como *P. aeruginosa*. A estirpe foi isolada de uma amostra colhida na torneira da sala de terapêutica do serviço B no decorrer da 3ª amostragem, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - *Pseudomonas aeruginosa* isolada do ambiente

Nº estirpe	Serviço	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
75	B	Huc3 30(P)	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 T	99,91

Micobacterium* não *tuberculosis

Foram isoladas três estirpes de *Mycobacterium gordonae,* (Tabela 2) a partir de amostras colhidas nas bancadas da sala de terapêutica do serviço A (amostra HUC3 10 (M)) e do serviço B (amostra HUC3 29 (M)). A outra estirpe foi isolada a partir de uma amostra colhida na mesa de cabeceira B do serviço B (amostra HUC3 35 (M)).

Tabela 2 - *Micobacterium* não *tuberculosis* isolados do ambiente

Serviço	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
A	HUC3 10 (M)	*Mycobacterium gordonae*	98,00
B	HUC3 29 (M)	*Mycobacterium gordonae*	98,00
B	HUC3 35 (M)	*Mycobacterium gordonae*	99,00

4.4.2 – Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

O laboratório de microbiologia dos CHUC, cedeu os isolados das amostras clinicas efetuadas aos doentes internados nos serviços onde foram colhidas as amostras ambientais para comparação. A tabela 3 mostra as *P. aeruginosa* isoladas nesse período de tempo. A comparação da sequência do gene que codifica o rRNA 16S dos isolados com as estirpes tipo nas bases de dados mostrou que estas possuem um grau de semelhança entre 98,57% e 99,9% confirmando a sua identificação como *P. aeruginosa*. As estirpes foram isoladas no decurso das três amostragens, sendo duas da 1ª, uma da 2ª e quatro da 3ª amostragem.

Tabela 3 – Amostras clinicas de *Pseudomonas aeruginosa*

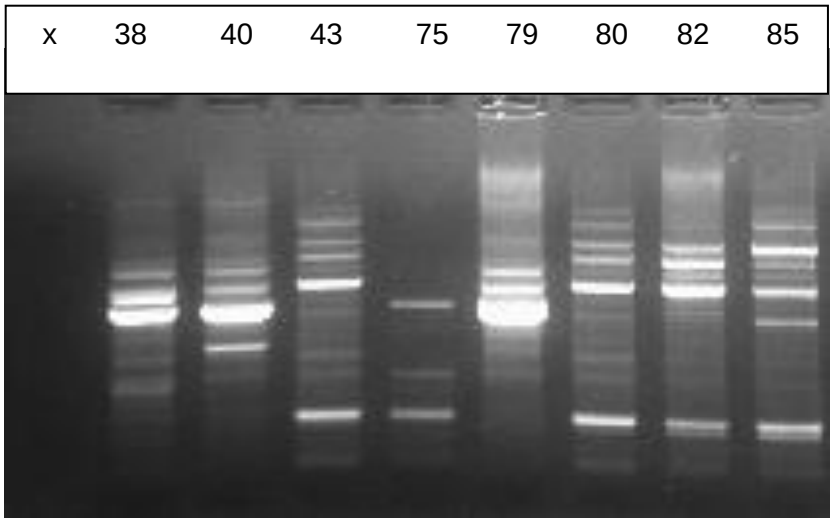
Nº estirpe	Serviço	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
38	C	HUC1 CM87182	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,82
40	C	HUC1 CM87153	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,87
43	B	HUC2 CM89366	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,90
79	B	HUC3 CM97247	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	98,57
80	B	HUC3 CM97484	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,82
82	B	HUC3 CM94919	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,90
85	B	HUC3 CM97394	*Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242 (T)	99,89

Com o objetivo de relacionar as estirpes isoladas no ambiente com as estirpes isoladas nas amostras clínicas, as estirpes foram tipadas por RAPD. Esta técnica permite comparar ou diferenciar as estirpes da mesma espécie, pela análise do tamanho e numero dos fragmentos obtidos por PCR na presença de um único *primer*.

4.4.3 - RAPD das *Pseudomonas aeruginosa* (ambiental e clinicas)

A figura 8 mostra o perfil RAPD das estipes clinicas (38,40,43,79,80,82,85) e ambientais (75) de *Pseudomonas aeruginosa.* As estirpes 43 e 80 apresentam um padrão semelhante indicando terem uma provável origem clonal. A estirpe ambiental apresentou um padrão diferente.

Figura 8 – RAPD de *Pseudomonas aeruginosa* clinicas e ambiental



4.5 – ISOLADOS DE OUTROS GRUPOS TAXONÓMICOS NOS MEIOS SELETIVOS PIA E MACCONKEY E RESPETIVO RAPD

Nos meios seletivos foram conjuntamente isolados e identificados microrganismos diferentes de P.*aeruginosa* e *Klebsiella.* Do meio PIA foram identificados todos os isolados que apresentaram fluorescência e do meio MacConkey os isolados que apresentaram um aspeto colonial típico e que produziram ácido em meio KIA.

Pseudomonas plecoglossicida

A tabela 4 lista as estirpes de *Pseudomonas plecoglossicida* isoladas no ambiente. Estirpes desta espécie foram só detetadas na 1ª amostragem e apenas no serviço A.

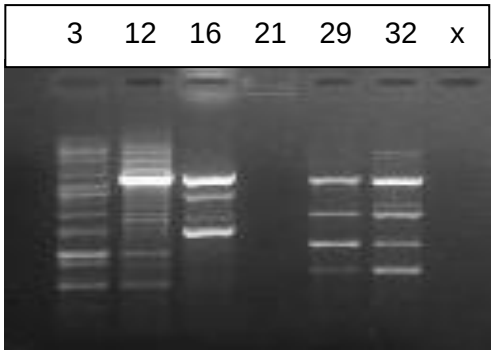
As estirpes foram detetadas nos seguintes equipamentos: chuveiros (amostras, HUC1 4 (K), HUC1 4 (P), HUC1 16B (P) e HUC1 16C (P)) e ralo de um lavatório (amostras HUC1 3A (P) e HUC1 3C (P)) que se encontram na mesma casa de banho.

Tabela 4 - *Pseudomonas plecoglossicida* isoladas no ambiente

Estirpe	Serv.	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
3	A	HUC1 4 (K)	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951 (T)	99,30
12	A	HUC1 16B (P)	*Pseudomonas plecoglos*sicida FPC 951 (T)	99,61
16	A	HUC1 16C (P)	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951 (T)	99,60
21	A	HUC1 4A (P)	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951 (T)	99,61
29	A	HUC1 3A (P)	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951 (T)	99,85
32	A	HUC1 3C (P)	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951 (T)	99,74

A figura 9 mostra a comparação das estirpes por RAPD. As estirpes ambientais (3, 12, 16, 21, 29, 32) de *Pseudomonas plecoglossicida.* A análise padrão mostra que as estirpes 12 e 16, isoladas do mesmo local (chuveiro), são diferentes e que as estirpes 29 e 32 (ralo de lavatório) isoladas no mesmo local têm um padrão semelhante.

Fig. 9 - RAPD de *Pseudomonas plecoglossicida*



Staphilococcus haemolyticus

A tabela 5 lista as estirpes de *Staphilococcus haemolyticus* isolados no ambiente. Estirpes de *Staphilococcus haemolyticus* foram isoladas nos três serviços amostrados, embora predominantemente no serviço C. Nos serviços A e B foram identificadas, em cada um deles, uma estirpe na 1ª e 3ª amostragem, respetivamente.

Estirpes de *Staphilococcus haemolyticus* foram isoladas em diferentes equipamentos como chuveiros (amostras HUC1 16B (K), HUC3 38A (K) HUC 2 49A (P)), pega da cabeceira (HUC1 55 B (K) e HUC 2 55 (K)) e candeeiros (HUC 2 58 (K) e HUC3 58B (K)).

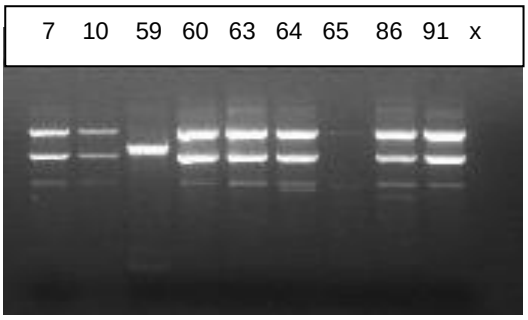
Tabela 5 - *Staphilococcus haemolyticus* isolados no ambiente

Estirpe	Serviço	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
7	C	HUC1 55 B (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
10	A	HUC1 16B (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
59	C	HUC 2 49A (P)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	98,46
60	C	HUC 2 43 (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
63	C	HUC 2 55 (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
64	C	HUC 2 50 (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
65	C	HUC 2 58 (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	98,88
86	C	HUC3 58B (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100
91	B	HUC3 38A (K)	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 (T)	100

A figura 10, mostra os resultados da tipagem por RAPD das estirpes de *Staphilococcus haemolyticus* isolados no ambiente. As estirpes 60 e 63, correspondendo respetivamente, a isolados do carro de terapêutica e da pega de cabeceira de cama, na enfermaria C e a estirpe 91, isolada de um chuveiro da enfermaria B, apresentam o

mesmo padrão, como tal podem ter uma origem clonal. As restantes estirpes, pela análise do perfil das bandas obtidas, são estirpes diferentes.

Figura 10 - RAPD de *Staphilococcus haemolyticus*



Staphylococcus hominis sub esp. novobiosepticus

A tabela 6 mostra as estirpes de *Staphylococcus hominis sub. esp. Novobiosepticus* isolados no ambiente. A estirpe em causa apenas foi identificada na 3ª amostragem, contudo encontra-se dispersa pelos três serviços.

As mesas-de-cabeceira (amostras HUC3 26B (K) e HUC3 52B (K)), os manípulos das portas (amostras HUC3 17A (K) e HUC3 53 (K)), a pega da cabeceira da cama (amostra HUC3 55 (K)) e o candeeiro da cama (amostra HUC3 58A (K)), são os locais onde se identificou a referida estirpe.

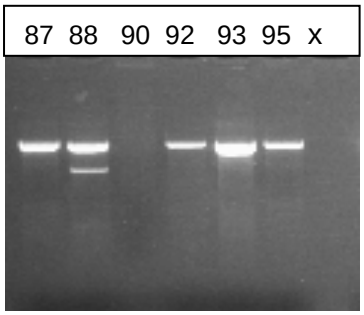
Tabela 6- *Staphylococcus hominis sub. esp. Novobiosepticus* isolados no ambiente

Estirpe	Serv.	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
87	C	HUC3 55 (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,91
88	B	HUC3 26B (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,91
90	C	HUC3 52B (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,90
92	C	HUC3 53 (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,91
93	C	HUC3 58A (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,91
95	A	HUC3 17A (K)	*Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus* GTC 1228 (T)	99,91

A figura 11 mostra o perfil RAPD, das estirpes de *Staphylococcus hominis sub esp. Novobiosepticus.* Podemos observar que as imagens obtidas apresentam um padrão muito semelhante e com poucas bandas, o que não nos permite afirmar com um grau

de certeza, tratar-se da mesma estirpe ou de estirpes diferentes, contudo também não podemos excluir a hipótese de o serem. Para que tal pudesse acontecer, seria necessário o recurso a outra técnica que gerasse uma maior descriminação entre as estirpes em causa.

Figura 11 - RAPD de *Staphilococcus hominis sub. esp. Novobiosepticus*



Stenotrophomonas maltophilia

A tabela 7 lista as estirpes de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas no ambiente. As estirpes foram isoladas na 1ª e 3ª amostragem, nos serviços A e B. No serviço A, a espécie foi isolada na torneira da sala de terapêutica (amostras, HUC1 11 (K) e HUC3 11 (P)) nas duas amostragens referidas. Estirpes desta espécie foram ainda isoladas nos seguintes equipamentos: amostra HUC1 30C P correspondente à torneira da sala de enfermagem, mas do serviço B;

A amostra HUC 1 23A (K), correspondente a um chuveiro do serviço B, na primeira amostragem. Este chuveiro foi substituído no intervalo da 1ª para a 2ª amostragem, tal como referido anteriormente.

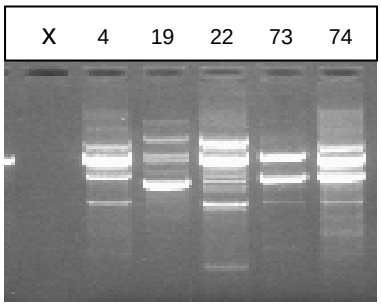
Tabela 7 - *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas do ambiente

Estirpe	Serviço	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
4	A	HUC1 11 (K)	*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T)	99,38
19	B	HUC1 23A (K)	*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T)	99,54
22	B	HUC1 30C (P)	*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T)	99,64
73	A	HUC3 3 (P)	*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T)	96,2
74	A	HUC3 11 (P)	*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T)	99,43

A figura12 mostra o perfil RAPD, das estirpes de *Stenotrophomonas maltophilia* isolados no ambiente. Pela análise pode-se concluir que as estirpes 4 e 74 apresentam um

padrão semelhante. Salienta-se ainda o facto, destas estirpes terem sido isoladas de amostras colhidas no mesmo serviço, mas em tempos diferentes.

Figura 12 – RAPD de *Stenotrophomonas maltophilia*



4.6 – OUTRAS ESPÉCIES ISOLADAS NO AMBIENTE COM MENOR FREQUÊNCIA

Como se pode observar pela análise da tabela 8, foram ainda isolados outros microrganismos ambientais pertencentes aos géneros; *Staphylococcus, Sphingobium Pseudomonas, Citrobacter, Sphingobium* e *Methylobacterium,* entre outras menos frequentes. Estes isolados são provenientes dos três serviços amostrados e foram isoladas também a partir das três amostragens efetuadas.

Paralelamente foi isolada de um chuveiro (amostra HUC1 38 (K) do serviço B, uma *Raoultella planticula*.

Tabela 8 – Microrganismos ambientais isolados e não tipados

Serv.	Amostra	Microrganismo	% de semelhança
C	HUC1 45 B (P)	*Citrobacter freundii* DSM 30039 (T)	99,22
A	HUC1 3B (P)	*Citrobacter freundii* DSM 30039 (T)	99,87
B	HUC 2 23 (P)	*Citrobacter freundii* DSM 30039 (T)	99,63
A	HUC1 15 (K)	*Cupriavidus pauculus* LMG 3413 (T)	98,04
C	HUC1 48 (K)	*Delftia tsuruhatensis* T7 (T)	100
B	HUC1 30B (P)	*Pseudomonas Batelli* ATCC19861 (T)	98,37
B	HUC1 23 (K)	*Pseudomonas Batelli* ATCC19861 (T)	98,34
B	HUC1 40 (K)	*Pseudomonas Batelli* ATCC19861 (T)	99,18
A	HUC 11B (P)	*Pseudomonas Batelli* ATCC19861 (T)	99,54
B	HUC1 38C (P)	*Pseudomonas monteilli* CIP 104883 (T)	99,8
C	HUC 2 38B (P)	*Pseudomonas monteilli* CIP 104883 (T)	99,8
B	HUC1 30 A (P)	*Pseudomonas geniculata* ATCC 19374 (T)	99,8
A	HUC116A (P)	*Pseudomonas taiwanensis* BCRC 17571 (T)	99,59
A	HUC1 4 (M)	*Pseudomonas mucidolens*	98,00

B	HUC 1 40 (M)	*Pseudomonas trivialis*	99,00
A	HUC3 4 (P)	*Pseudoxanthomonas spadix* IMMIB AFH 5 (T)	97,99
B	HUC1 38 (K)	*Raoultella planticula* DSM 3069 (T)	99,8
A	HUC 11B (P)	*Sphingobium scionense* WP01 (T)	99,79
C	HUC1 45A (P)	*Sphingobium yanoikuyae* GIFU 9882 (T)	99,24
A	HUC1 4C (P)	*Sphingobium yanoikuyae* GIFU 9882 (T)	99,37
A	HUC 11A (P)	*Sphingobium yanoikuyae* GIFU 9882 (T)	99,7
C	HUC 45C (P)	*Sphingobium yanoikuyae* GIFU 9882 (T)	99,67
A	HUC3 11 (K)	*Staphylococcus epidermitis* ATCC 14990 (T)	100
B	HUC 2 27 (K)	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (T)	100
A	HUC 2 6 (K)	*Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius* ATCC 35844(T)	100
B	HUC3 26A K	*Staphylococcus cohnii sub.esp cohnii* ATCC 29974 (T)	100
B	HUC1 28 (K)	*Staphylococcus cohnii sub.esp urealyticus* ATCC 49330 (T)	97,6
C	HUC1 55A (K)	*Staphylococcus cohnii sub.esp urealyticus* ATCC 49330 (T)	100
A	HUC3 13B (K)	*Staphylococcus waneri* 27839 (T)	99,91
A	HUC3 13 A (K)	*Staphylococcus waneri* 27839 (T)	99,91
C	HUC1 54 (M)	*Methylobacterium radiotolerans*	97,00
C	HUC155 A (M)	*Methylobacterium radiotolerans*	98,00
C	HUC155 B (M)	*Gordonia sputi*	98,00
C	HUC1 56 (M)	*Methylobacterium radiotolerans*	94,00
A	HUC1 6 (M)	*Methylobacterium radiotolerans*	93,00
A	HUC1 18 (M)	*Methylobacterium radiotolerans*	95,00
A	HUC1 18 (M)	*Sphingomonas oligophenolica*	95,00

4.7 – ISOLADOS CLÍNICOS

O quadro 18 mostra todas as estirpes dos microrganismos em estudo isoladas em culturas efetuadas de produtos biológicos colhidos em doentes internados nos serviços amostradas, durante o período em que este estudo decorreu e que foram cedidas como referenciado, pelo laboratório de microbiologia do CHUC.

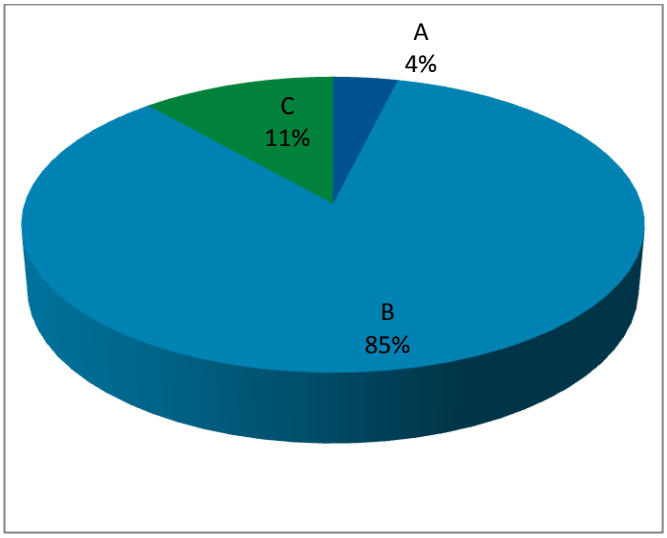
A análise da tabela permite-nos verificar que o isolamento dos microrganismos em estudo teve origem na cultura dos mais diversos produtos biológicos como: urina, sangue, expetoração, exsudado de ferida cirúrgica e abcesso.

Quadro 18 – Amostras clínicas

NÚMERO	AMOSTRAGEM	AMOSTRA	SERVIÇO	ESTIRPE	PRODUTO
1	HUC1	M87589	B	*K. pneumoniae*	URINA
2	HUC1	M86863	B	*K. pneumoniae*	URINA
3	HUC1	M87587	B	*K. pneumoniae*	SANGUE
4	HUC1	M83212	C	*K. oxytoca*	URINA
5	HUC1	M87182	C	*P. aeruginosa*	URINA
6	HUC1	M87153	C	*P. aeruginosa*	URINA
7	HUC2	M89366	B	*P.aeruginosa*	EXPETORAÇÃO
8	HUC2	M90496	B	*K. pneumoniae*	FER. CIRURGICA
9	HUC2	M90498	B	*K. pneumoniae*	EXPETORAÇÃO
10	HUC2	M89094	B	*K. pneumoniae*	SANGUE
11	HUC2	M88273	B	*K. pneumoniae*	EXPETORAÇÃO
12	HUC2	M89096	B	*K. pneumoniae*	URINA
13	HUC2	M90185	A	*K. pneumoniae*	SANGUE
14	HUC2	M91245	B	*K. pneumoniae*	URINA
15	HUC2	M91043	B	*K. pneumoniae*	SANGUE
16	HUC2	M91044	B	*K. pneumoniae*	URINA
17	HUC2	M92154	B	*K. pneumoniae*	URINA
18	HUC3	M95492	B	*K. pneumoniae*	URINA
19	HUC3	M95459	B	*K. pneumoniae*	URINA
20	HUC3	M94919	B	*P.aeruginosa*	FER. CIRURGICA
21	HUC3	M95973	B	*K. pneumoniae*	ABCESSO
22	HUC3	M96882	B	*P.aeruginosa*	FER. CIRURGICA
23	HUC3	M97247	B	*P.aeruginosa*	URINA
24	HUC3	M97484	B	*P.aeruginosa*	URINA
25	HUC3	M97394	B	*P.aeruginosa*	EXPETORAÇÃO
26	HUC3	M94561	B	*K. pneumoniae*	URINA

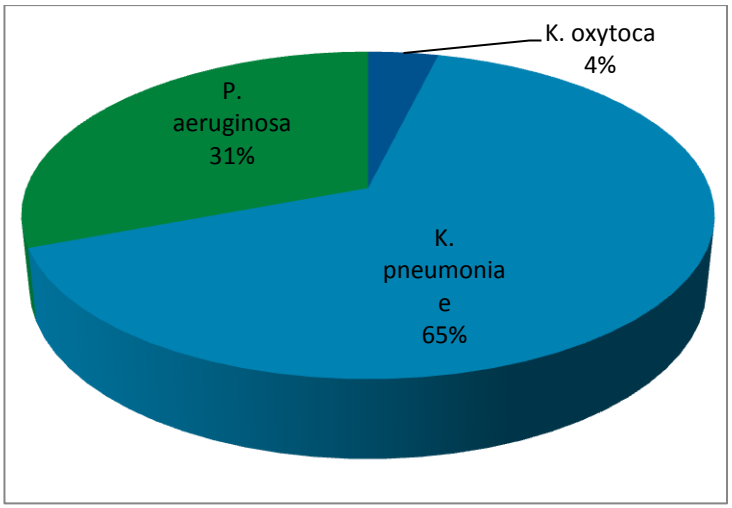
O gráfico 1 representa o número de amostras clínicas distribuídas pelos três serviços alvo do estudo. Pela analise do gráfico podemos concluir que a grande maioria das amostras (85%), veio do serviço B, seguido do serviço C com 11% das amostras. O serviço A representou apenas 4% dos microrganismos em estudo isolados.

Gráfico 1 – Isolados clínicos por serviço



No total de 26 microrganismos provenientes de amostras clinicas, a maioria, 65% trata-se *de Klebsiella pneumoniae*, seguindo-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*. O gráfico 2 mostra a representatividade em termos percentuais das três bactérias em estudo.

Gráfico 2 – Isolados clínicos



4.8 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS

A estirpe de *P. aeruginosa* identificada no ambiente foi submetida ao teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão de disco, para posterior comparação com as amostras clinicas.

4.8.1 – Ambientais

A tabela 9 apresenta os resultados do teste de sensibilidade a antibióticos da estirpe de *P.aeruginosa* isolada no ambiente. A estirpe em causa é resistente à maioria dos antibióticos testados, apenas sensível à polimixina, Ceftriaxone, ciprofloxacina, colistina e gentamicina.

Tabela 9 – Teste de sensibilidade aos antibióticos da amostra HUC3 30 (P)

ANTIBIOTICO	SENSIBILIDADE *
OFLOXACINA	I
NÉOMICINA	R
AMOX. AC.CLAV.	R
CEFALOTINA	R
CEFTAZIDIMA	R
DOXICILINA	R
POLIMIXINA	S
RIFAMPICINA	R
CEFTRIAXONE	S
NETILMICINA	I
AMPICILINA	R
LINCOMICINA	R
CIPROFLOXACINA	S
COLISTINA	S
VANCOMICINA	R
PENICILINA G	R
TETRACICLINA	R
GENTAMICINA	S
ESTREPTOMICINA	R
CLORANFENICOL	R
ERITROMICINA	R
TOBRAMICINA	R
KANAMICINA	R

*R- Resistente, I – Intermédio, S – Sensível

4.8.2 - Clínicas

O quadro 19 lista as estirpes clínicas e o perfil de sensibilidade aos antibióticos testados pelo laboratório de microbiologia do CHUC (cada número de identificação corresponde à respetiva amostra clínica apresentada no quadro 18). Observa-se que as estirpes isoladas são resistentes à maioria dos antibióticos testados. O meropenem, a amicacina e a colistina, são os antibióticos para os quais as estirpes em causa se revelaram mais sensíveis.

Quadro 19 - Perfil de sensibilidade aos antibióticos das amostras clinicas (*)

num.	amp.	amox. ac. c.	cefu.	cefo.	ceft.	mer.	lev.	gent.	cip.	trim.	amic.	cefalot.	colist.	pip. taz.	nitr.
1	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	R	R
2	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	_	I
3	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	R	_
4	R	S	S	_	_	_	_	S	S	S	_	S	_	S	I
5	_	_	_	_	R	R	_	S	R	_	S	_	_	R	_
6	_	_	_	_	S	_	_	S	R	_	_	_	_	I	_
7	_	_	_	_	R	R	_	R	R	_	R	_	S	R	_
8	R	I	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	_
9	R	_	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	_
10	R	_	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	_
11	R	R	_	R	R	S	R	R	R	R	I	R	_	I	_
12	R	I	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	R	R
13	R	S	_	_	_	_	_	S	S	S	_	S	_	S	_
14	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	S	I
15	R	I	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	_
16	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	R
17	R	I	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	I
18	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	R
19	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	S	R
20	_	_	_	_	R	R	_	R	R	_	R	_	S	R	_
21	R	R	_	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	I	_
22	_	_	_	_	R	R	_	R	R	_	R	_	S	_	_
23	_	_	_	_	I	_	_	R	R	_	S	_	S	R	_
24	_	_	_	_	R	R	_	R	R	_	R	_	S	R	_
25	_	_	_	_	R	R	_	R	R	_	R	_	S	R	_
26	R	_	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	_	S	I

*R- Resistente, I – Intermédio, S – Sensível

5 - DISCUSSÃO

O trabalho prático desenvolvido teve como finalidade dar resposta aos objetivos e questões de investigação formuladas. Determinou-se o grau de contaminação ambiental e a prevalência de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e MNT em doentes internados nos serviços amostrados e também no ambiente hospitalar desses mesmos serviços.

Como referido, as três amostragens decorreram com intervalos de um mês. Foi avaliado o grau de contaminação ambiental, para tal, foi enumerada por cultivo e agrupada em três classes, o número de colónias presentes em cada amostra. Este processo foi efetuado utilizando três meios seletivos, cada um dos quais recupera diferentes grupos de microrganismos.

O meio PANTA foi aquele que permitiu a recuperação de um maior número de bactérias comparativamente com a recuperação nos outros meios. Neste meio as amostras estão uniformemente distribuídas pelas três classes de contaminação, com exceção das amostras da segunda amostragem em que não se observaram amostras com um grau de contaminação intermédio. Na primeira amostragem observamos 18 amostras com um grau de contaminação alto e nas restantes amostragens cerca de 13. Este resultado poder-se-á dever ao facto do mês de novembro ter sido mais seco que os seguintes em que decorreram as colheitas, aumentando assim a humidade das superfícies e do ambiente, mas também a outros fatores como, por exemplo, a hora a que foram feitas as limpezas. Só a continuidade do estudo permitirá tirar conclusões relativas a este aspeto. Este meio permitiu ainda o isolamento de vários fungos no decurso das três amostragens.

As amostras quando inoculadas em meio PIA apresentaram quase sempre um grau de contaminação nas classes baixo e alto. Apenas na terceira amostragem se observou uma amostra com um grau de contaminação que se insere na classe intermédia. O número de amostras com grau de contaminação alto em meio PIA foi semelhante em todas as amostragens, sendo de 12 na primeira, 13 na segunda e 10 na terceira. Este meio seletivo ao selecionar bactérias capazes de crescer na presença de um desinfetante (Igarsan®), permitiu a recuperação e identificação de espécies de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem, dos quais será feita uma breve referência mais à frente.

Em meio MacConkey, o número de amostras em cada uma das classes não sofreu oscilações significativas no decurso da investigação, com uma média de 8 amostras na classe alto, 3 na classe médio e as restantes na classe baixo. Este meio permitiu também a recuperação e identificação de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem, dos quais será feita referência mais à frente.

Ainda que com um ligeiro decréscimo, o serviço A foi aquele onde se obteve um maior número de amostras com um grau de contaminação alto em todas as amostragens (17 na primeira, 16 na segunda e 14 na terceira) nos três meios de cultura utilizados.

As amostras colhidas em locais húmidos foram aquelas onde se recuperou um maior número de colónias. O interruptor do wc do quarto 3, na primeira amostragem, foi o único local seco onde foi recuperado um número de colónias incontáveis em meio PANTA, apresentando portanto, um grau de contaminação alto. Os chuveiros, as torneiras e o ralo do lavatório, são os locais que, em todas as amostragens efetuadas, apresentaram um grau de contaminação elevado.

No serviço B, observaram-se na primeira amostragem 15 amostras com um grau de contaminação alto, 13 na segunda amostragem e 9 na terceira. Este decréscimo pode ter na sua origem diversos fatores. Na primeira amostragem a equipa de investigadores da FCTUC foi acompanhada por uma enfermeira do serviço que os recebeu e os acompanhou durante a recolha das amostras, ficando a conhecer os locais amostrados e o nível de higienização dos mesmos. Na segunda amostragem, verificou-se que um dos chuveiros que anteriormente tinha apresentado um grau de contaminação alto, tinha sido substituído, passando a apresentar um baixo número de colónias em todos os meios utilizados. Na terceira amostragem, apesar de decorrer sensivelmente à mesma hora das anteriores, parte dos equipamentos onde foram colhidas as amostras já tinham sido higienizados.

As torneiras e os chuveiros são os locais do serviço B que apresentam um grau de contaminação alto nos três meios de cultura utilizados.

Na primeira amostragem observou-se ainda um nível de contaminação alta nas amostras retiradas no fundo da cama, mesa-de-cabeceira, campainha da entrada da enfermaria e na arrecadação da roupa limpa e enumeradas em meio PANTA. Nas amostragens seguintes, as amostras colhidas nestes locais revelaram um grau de contaminação inferior. No caso das amostras da arrecadação, as diferenças observadas entre amostragens podem dever-se ao facto do local onde foi recolhida a amostra ser diferente (prateleira de madeira na 2ª amostragem e prateleira superior na 3ª) e nas restantes devido a uma melhor higienização das superfícies. O aumento do nível de

humidade do ambiente pode ser também um aspeto a ter em conta, pelo exposto anteriormente.

O serviço C apresentou na primeira amostragem, 6 amostras com um grau de contaminação alta, decresceu para 5 na segunda e subiu para 7 na terceira amostragem. As torneiras e os chuveiros foram os locais cujas amostras revelaram um maior número de microrganismos, independentemente do meio de cultura utilizado na avaliação ou da amostragem. São focos de contaminação a ter em conta, aspeto que vem ao encontro do estudo realizado por Aumeran *et al.* (2007) numa unidade pediátrica, em que 8 crianças apresentavam *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida* em amostras colhidas em cateteres centrais. Nesse trabalho foi provado que a infeção tinha origem na água dos chuveiros e das torneiras. Este problema foi ultrapassado com a adição de cloro na água e com a colocação de filtros nas torneiras e chuveiros com uma durabilidade de 7 dias (Aumeran *et al.,* 2007).

No presente estudo foi apenas identificada uma estirpe de *P. aeruginosa*, a partir da amostra colhida numa torneira da sala de terapêutica, no serviço B, na terceira amostragem. A identificação de um reduzido número de *P. aeruginosa* vem contrariar outros estudos que referem um elevado nível de contaminação do ambiente e equipamentos hospitalares com *P. aeruginosa* (Moreira,2002; Caetano *et al*.,2011). Num estudo realizado no HF entre 2010 e 2011, o qual faz parte do projeto onde este trabalho também se insere, foram registadas 18% das amostras ambientais positivas para *P. aeruginosa* (Abreu *et al.,* 2011).

O tempo em que decorreu o nosso estudo comparativamente ao estudo referido foi muito mais curto e focado num determinado período. A ocupação das enfermarias é provavelmente diferente, uma vez que os 2 hospitais servem populações diferentes e, no caso do Algarve, este hospital tem picos no número de utentes que podem ser correlacionados com picos de contaminação ambiental.

No período em que decorreu este estudo foram isoladas 8 estirpes de *P. aeruginosa* a partir de amostras colhidas nos doentes internados nos serviços alvo do estudo. As estirpes foram identificadas a partir de amostras de urina (4), expetoração (2) e exsudado de ferida (2). A maioria das estipes, ou seja 6, foram identificadas no serviço B, as restantes provieram do serviço C. Relativamente ao serviço A, não foi isolada nenhuma estirpe de *P. aeruginosa*. Comparativamente com os outros microrganismos em estudo, os isolados de *P. aeruginosa,* representam 31% do total dos isolados clínicos, não nos permitindo a comparação com outros estudos atrás referenciados, uma vez que eles se referem ao total de microrganismos isolados e no presente estudo só foram tidos em conta os três grupos filogenéticos em estudo.

A comparação do padrão RAPD das estirpes de *P. aeruginosa* clínicas e ambiental sugere tratarem-se de estirpes diferentes, ou seja, a estirpe isolada no ambiente e as estirpes isoladas a partir de amostras colhidas nos doentes internados não têm a mesma origem.

A análise do perfil RAPD das estirpes isoladas a partir das amostras clinicas permitiu concluir que duas das estirpes apresentam um padrão semelhante, o que pode ser indicativo de origem clonal. As duas estipes foram isoladas no serviço B, em meses diferentes e a partir de produtos biológicos diferentes. Não foi possível concluir tratar-se da mesma pessoa ou de pessoas diferentes, infetadas pela estirpe em causa, dado que a informação fornecida pelo laboratório de microbiologia do CHUC, foi cedida garantindo a confidencialidade dos doentes.

Conjuntamente com os isolados clínicos, o laboratório de microbiologia dos CHUC cedeu o perfil de sensibilidade aos antibióticos para cada estirpe. Todos os isolados clínicos apresentam um perfil de multirresistência aos antibióticos testados. A maioria das estirpes revelou um padrão de resistência para a maioria dos seguintes antibióticos: ceftazidima, cefotaxima, levofloxacina, gentamicina, ciprofloxacina, cefalotina e trimetropim/sulfametoxazol. Os antibióticos, meropenem, amicacina e colistina foram aqueles a que a maioria das estirpes clinicas revelou sensibilidade**.**

No laboratório de microbiologia da FCTUC, procedeu-se ao teste de sensibilidade aos antibióticos da estirpe ambiental de *P. aeruginosa* para comparação. Foi possível constatar que a estirpe isolada no ambiente é resistente à grande maioria dos antibióticos testados, mas sensível à polimixina, ceftriaxone, ciprofloxacina, colistina e gentamicina. Comparando as estirpes clínicas e ambiental sobressai o padrão multirresistente de ambas e têm em comum o perfil de sensibilidade à colistina. Alguns dos antibióticos testados nas estirpes clinicas não foram testados na amostra ambiental por não estarem disponíveis na FCTUC, aspeto que não permite fazer uma comparação mais aproximada entre as estirpes.

Relativamente ao género *Klebsiella spp* não se detetaram estirpes deste género no ambiente através da metodologia utilizada para a sua deteção.

O fato de não se ter detetado nenhuma estirpe do género *Klebsiella* no ambiente e equipamentos clínicos pode significar: 1) a necessidade de utilização de um outro meio de cultura que seja mais direcionado para a recuperação apenas de estirpes de *Klebsiella*, 2) pode ser indiciador de que a fonte de origem das estirpes de *Klebsiella* não está no ambiente ou equipamentos estudados, mas noutro local ou equipamentos.

No período em que decorreu a investigação, num total de 26 isolados clínicos, 18 deles pertenciam ao género *Klebsiella*, ou seja 69% do total. Dentro desse conjunto de isolados, 17 eram *Klebsiella pneumoniae* (65%) e 1 *Klebsiella oxytoca* (4%), aspeto que vem ao encontro dos estudos referenciadas por Murray *et al.,* (2006).

No serviço B foram isoladas 16 das 17 estirpes de *Klebsiella pneumoniae* o que significa que continua a ser um problema muito particular deste serviço, tal como tinha sido sinalizado pela CCI do CHUC. Os doentes deste serviço, dado a sua patologia de base, são pessoas mais vulneráveis devido à terapêutica imunossupressora a que estão sujeitos e à grande carga de antibioterapia a que estiveram e estão expostos (Mims *et al.,*1999; Murray *et al.*, 2006;Lima, 2007).

O facto de não se ter isolado nenhuma estirpe do género *Klebsiella* no ambiente, e mais especificamente no serviço B, implica a continuação do estudo para despistar outros locais que possam servir de reservatório às estirpes do género microbiano em causa. Assim pode-se sugerir a amostragem do bloco operatório, a sala de tratamentos e outros equipamentos não incluídos neste estudo.

As mãos dos profissionais que desenvolvem a sua atividade no referido serviço e mesmo noutros, também podem ser alvo de estudo, pois, é sabido que as mãos dos profissionais de saúde são local de eleição para o desenvolvimento destes microrganismos (Mims *et al*., 1999).

Contudo, foi identificada uma estirpe de *Raoultella planticula* isolada a partir de uma amostra colhida num chuveiro do serviço B (amostra HUC1 38 K). Esta espécie até 2001 fez parte do género *Klebsiella* e que começa a ser considerada clinicamente importante*.* A *Raoultella planticula* é uma bactéria presente em meios aquáticos, solo e plantas, e tem vindo a ganhar importância pela sua identificação como causa de infeções de órgãos, como complicação pós-cirúrgica e bacteriemias (Alves, Riley e Moreira,2007). Trata-se de espécie que só muito recentemente começou a ser alvo de atenção pelo isolamento de estirpes multirresistentes em doentes internados nos hospitais (*idem*). Não sendo uma espécie muito frequente nos hospitais portugueses, foi isolada, no ano transato num doente internado no hospital onde este estudo foi desenvolvido.

Relativamente às MNT e dado que podem ter um período de incubação longo, como já referido anteriormente, neste momento ainda só é possível apresentar os resultados parciais, tendo sido identificadas até ao momento 3 estirpes de *Mycobacterium gordonae* no ambiente. Dentro das MNT esta é a espécie mais frequentemente isolada a partir de amostras colhidas em água de rios, piscinas e torneiras (Leoni *et al*.,1999; Lee *et al.,*2008)

Trata-se de uma micobactéria de crescimento lento, infetando doentes imunodeprimidos, causando infeções pulmonares (Asija, Prasad e Eskridje,2011). Os mesmos autores relatam um caso de uma doente que apresentava um nódulo pulmonar, sem sintomatologia respiratória, que após biopsia do nódulo revelou pneumonia necrosante granulomatosa, com culturas positivas para *Mycobacterium gordonae.* A doente foi medicada com uma associação de três antibióticos ao longo de 12 meses, após os quais se verificou uma remissão completa da doença, comprovada pela realização de tomografia axial computorizada com emissão de positrões. O mesmo estudo concluiu ainda pela necessidade em realizar mais estudos para compreender a patogénese da infeção por *Mycobacterium gordonae* em humanos.

No período de tempo em que decorreu esta investigação não foi isolada nenhuma estirpe de MNT em doentes internados nos serviços em estudo. Esta ausência de identificação de MNT em doentes internados pode dever-se a diversos fatores: 1) ao longo período de tempo necessário para o seu crescimento (Murray *et al.*, 2004), que faz com que nesse momento o doente tenha tido alta; 2) à prescrição de antibióticos de largo espetro assim que o doente apresenta sinais de infeção; 3) na maioria das vezes o médico não especifica MNT quando pede cultura de espécimes aos doentes.

No decorrer da investigação foram isolados do ambiente, microrganismos de outros grupos taxonómicos que não eram alvo do estudo mas que cresceram nos meios utilizados. Entendeu-se destacar alguns, pelo seu potencial patogénico, pela sua prevalência e/ou pela sua persistência no ambiente e equipamentos amostrados. Dentro desse conjunto de isolados ambientais destaca-se *Pseudomonas plecoglossicida*, *Staphylococcus haemolyticus, Staphilococcus hominis sub esp. novobiosepticus* e *Stenotrophomonas maltophilia.* Seguidamente é feita uma breve abordagem a cada uma das espécies referenciadas

Pseudomonas plecoglossicida:

Foram isoladas 5 estirpes desta espécie, todas a partir de amostras colhidas no serviço A, no decurso da primeira amostragem. O chuveiro da sala grande, o ralo do lavatório e o chuveiro do quarto 3 da referida enfermaria, foram os equipamentos a partir dos quais foram colhidas as amostras que conduziram ao isolamento desta bactéria. Pela análise do padrão RAPD, pode-se observar que as estirpes isoladas nos dois chuveiros são diferentes, o que permite afirmar que os chuveiros estavam colonizados por estirpes diferentes, não tendo havido transferência destas estirpes entre os referidos equipamentos.

As estirpes isoladas no ralo têm origem no mesmo organismo, como se pode confirmar pela análise do padrão RAPD, contudo, é natural que tal suceda uma vez que foram isoladas a partir do mesmo local e da mesma amostra.

Conclui-se assim que, *Pseudomonas plecoglossicida* sendo uma espécie com um número importante de isolados na primeira amostragem, apenas foi observada no serviço A o que permite concluir, tratar-se de uma bactéria com relevância hospitalar limitada e esporádica.

Staphylococcus haemolyticus:

O género *Staphylococcus* faz parte da flora normal da pele e mucosas do ser humano. No entanto, a espécie *Staphylococcus haemolyticus* é um patógeno oportunista que coloniza a pele humana e tem desenvolvido uma grande capacidade de resistência aos antibióticos. São causadores de infeção em doentes com patologia cardíaca submetidos a cirurgia, hemodialisados e diabéticos. Pode ser causador de septicémias, infeções do trato urinário e peritonite (Takeuchi *et al*.,2005).

No presente estudo foram isoladas 9 estirpes de *Staphylococcus haemolyticus*. As referidas estirpes foram isoladas maioritariamente a partir das amostras colhidas em chuveiros dos três serviços amostrados, seguida dos candeeiros pertencentes ao serviço C. Foram ainda isoladas duas estirpes a partir de amostras colhidas na mesma pega de cabeceira de cama, em duas amostragens diferentes.

Estas estirpes foram isoladas a partir de amostras colhidas nos três serviços amostrados, ainda que com maior predominância no serviço C. Em todas as amostragens efetuadas foram também isolados *Staphylococcus haemolyticus,* o que permite concluir tratar-se de uma espécie microbiana que persiste no ambiente e se encontra disseminada pelas enfermarias onde o estudo foi efetuado.

A análise do padrão RAPD destes isolados permite identificar o mesmo padrão entre as estirpes isoladas a partir das amostras colhidas no carro de terapêutica, na pega de cabeceira da cama no serviço C e a estirpe isolada a partir da amostra colhida do chuveiro B no serviço B. Este resultado sugere que as referidas estirpes podem ter origem clonal. Tendo sido estas três estirpes isoladas a partir de amostras colhidas em serviços diferentes e em amostragens diferentes pode-se também afirmar que persistem no ambiente e estão disseminadas no hospital.

Staphylococcus hominis sub esp. novobiosepticus:

Segundo Kloos *et al.* (1998), trata-se de uma nova subespécie de *Staphylococcus hominis*, isolado a partir de culturas de sangue, de uma ferida, de um abcesso da mama e de uma ponta do cateter, é descrito com base num estudo de 26 estirpes isoladas

entre 1989 e 1996. De acordo com os mesmos autores este microrganismo apresenta com frequência um perfil de multirresistência aos antimicrobianos.

Num estudo realizado numa unidade de cuidados intensivos de um hospital brasileiro, entre março e abril de 2006 (D`Azevedo *et al.,* 2008)., três doentes lá internados nesse período apresentaram infeção da corrente sanguínea causada por *Staphylococcus hominis sub esp. novobiosepticus.* Dois desses doentes acabaram por falecer e o terceiro teve alta após dois meses de internamento.

No nosso estudo esta espécie foi isolada a partir de amostras colhidas em mesas de cabeceira, manípulos de portas, de uma pega de cabeceira da cama e de um candeeiro. Foram identificadas 6 estirpes deste microrganismo em todos os serviços alvo do estudo, mas apenas no decurso da terceira amostragem. Tal, permite sugerir que estirpes desta espécie estavam no momento da amostragem disseminadas pelas enfermarias, mas não permite concluir pela sua persistência no ambiente, uma vez que foi isolada apenas na terceira e última amostragem deste estudo.

A análise do padrão RAPD, das referidas estirpes revelou-se muito semelhante, com poucas bandas, não permitindo fazer a descriminação entre elas. Para que tal fosse possível seria necessário testar outros *primers* que gerassem um maior número de bandas, permitindo eventualmente a discriminação. Outra hipótese seria o recurso a uma outra técnica com maior capacidade de descriminação, como por exemplo eletroforese de campo pulsado, técnica desenvolvida por Schawartz e Cantor em 1984, com recurso a um gel com um campo elétrico ortogonal e que permite a separação de moléculas de DNA, que devido ao seu tamanho não são possíveis de separar num gel de agarose (Teixeira, 2003). Esta técnica foi usada por Chaves (2005) no seu estudo com isolados provenientes de amostras clinicas de doentes internados numa unidade de cuidados intensivos.

Stenotrophomonas maltophilia:

Trata-se de uma bactéria existente no ambiente, que pode ser encontrada em meios aquáticos, plantas e animais. Pode ser causa de infeções em diversos órgãos e tecidos mas, é mais comumente isolada em infeções do trato respiratório. Trata-se de um patogénico hospitalar emergente, com o surgimento de estirpes multirresistentes a nível mundial. Infeta sobretudo doentes imunodeprimidos e está associada a uma alta taxa de mortalidade (Brooke, 2012). Trata-se de uma bactéria não referenciada no inquérito de prevalência das IACS em 2009, mas que em 2010, surge com a notificação de 9 casos (Portugal, 2010).

Estirpes desta espécie foram isoladas na primeira e terceira amostragens. Foram isoladas 5 estirpes de *Stenotrophomonas maltophilia* a partir de amostras colhidas nas torneiras da sala de terapêutica dos serviços A e B e num chuveiro do serviço B. Na torneira da sala de terapêutica do serviço A, a espécie foi isolada na primeira e terceira amostragens. No serviço B, foi apenas isolada na primeira amostragem, tanto em relação à amostra colhida na torneira como à amostra colhida no chuveiro. Como já foi referido anteriormente, o chuveiro A do serviço B foi substituído no intervalo entre a primeira e segunda amostragem. Este facto pode estar relacionado com o abaixamento do nível de contaminação do chuveiro, e com o facto de não se ter isolado mais nenhuma estirpe de *Stenotrophomonas maltophilia.* Foi ainda isolada uma estirpe a partir de uma amostra colhida no ralo do lavatório do serviço B, no decurso da terceira amostragem.

Pelo exposto pode-se concluir que *Stenotrophomonas maltophilia* persiste no ambiente do serviço A, aspeto que vem ao encontro de outros estudos que referem que esta espécie, em ambiente hospitalar, já foi isolada a partir de amostras colhidas em torneiras, lavatórios, monitores de pressão arterial, soluções desinfetantes e ocasionalmente das mãos dos profissionais de saúde (Almeida *et al.,*2005).

Outros microrganismos isolados no ambiente:

Ainda que com menor frequência foram isolados outros microrganismos ambientais com potencial patogénico como espécies pertencentes ao género *Staphylococcus,* isolados a partir de amostras colhidas em equipamentos secos como tabuleiros, mesas de cabeceira, pega de cabeceira de cama ou carro de terapêutica*.* Para além das já referenciadas, foram isoladas outras espécies pertencentes ao género *Pseudomonas,* isoladas a partir de torneiras e chuveiros e cortinado de uma sala de doentes, no serviço B.

Foram isoladas também estirpes de *Methylobacterium radiotolerans.* Trata-se de uma bactéria normalmente encontrada no ambiente, tendo já sido identificadas mais de 20 espécies. Pode ser causa de infeção em doentes imunodeprimidos, causando bacteriemia (Lai *et al.*, 2011). Estirpes desta espécie foram isoladas a partir de amostras colhidas em tabuleiro limpo e pega de cabeceira da cama, ambas no serviço C.

Algumas das estirpes identificadas como pertencentes à espécie *Methylobacterium radiotolerans,* podem ser na realidade espécies novas, uma vez que apresentam uma percentagem de semelhança com a estirpe tipo da espécie mais próxima que varia entre os 93 e os 95%, o mesmo acontece com a estirpe de *Sphingomonas oligophenolica* que apresenta apenas 95% de semelhança com a estirpe tipo da espécie mais próxima (Gomes, 1998) como se pode observar pela consulta da tabela 8.

Os resultados deste trabalho, atrás apresentados e agora discutidos, devem ser entendidos numa perspetiva formativa do investigador, que tendo de dar resposta a um requisito académico e ao mesmo tempo, preocupado com uma problemática cada vez mais atual das infeções adquiridas em ambiente hospitalar, pretende dar o seu contributo para a melhoria das práticas clinicas. No entanto, não podem ser feitas generalizações, pois os resultados são também fruto da especificidade dos diferentes contextos onde foram recolhidas as amostras. Não se pretende, por isso, fazer um juízo das práticas nem dos profissionais, muito menos este trabalho deve servir de termo de comparação entre os diversos serviços alvo do estudo.

Tendo este estudo decorrido num curto espaço de tempo, ainda que permitindo tirar algumas conclusões, revela algumas lacunas. O seu prolongamento no tempo, permitiria perceber se as espécies bacterianas em estudo se encontram presentes no ambiente de uma forma sazonal, ou se não estão presentes, ou se quando estão, como no caso de *P.aeruginosa,* é numa percentagem muito baixa comparativamente com outros estudos, nomeadamente o que foi realizado no hospital do Algarve e que faz parte do projeto de investigação onde este trabalho também se insere. Outro aspeto é o facto do estudo apenas ter sido feito em três serviços, o que não permite ter uma visão mais abrangente da instituição no que se refere aos aspetos relacionados com a contaminação ambiental da mesma, fazendo-se assim a análise dos resultados no contexto específico de cada serviço, como já foi referido.

Algumas das lacunas que emergem deste estudo, às quais já foi feita referência, resultam em parte de fatores económicos, pois envolveu uma avultada quantia monetária (materiais, reagentes, etc.), mas também do atraso na obtenção das respetivas autorizações e da necessidade de dar resposta aos requisitos académicos a que se destina, não permitindo assim que o estudo se prolongasse no tempo ou que fosse mais abrangente em termos de número de serviços estudados.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste estudo visou dar resposta aos objetivos e questões de investigação formuladas, no projeto de investigação.

O primeiro objetivo foi avaliar a presença de estirpes patogénicas oportunistas de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT em equipamentos e locais hospitalares. O desenvolvimento do trabalho permitiu a identificação de uma estirpe de *P. aeruginosa* a partir de uma amostra colhida numa torneira de uma sala de terapêutica e de três estirpes de *Mycobacterium gordonae,* isoladas a partir de amostras colhidas em duas bancadas de sala de terapêutica e numa mesa-de-cabeceira. Não foram identificadas estirpes do género *Klebsiella*. No entanto, foi isolada uma estirpe de *Raoultella planticula* até há pouco tempo considerada do género *Klebsiella* e filogeneticamente muito próxima.

No decorrer da investigação foram identificados outros microrganismos potencialmente patogénicos que não eram inicialmente objeto do estudo mas que cresceram nos meios seletivos utilizados. Considera-se assim, ter sido atingido este objetivo.

O segundo objetivo pretendia relacionar a presença de estirpes de *P. aeruginosa, Klebsiella spp* e de MNT com o nível de contaminação microbiológica dos materiais da unidade hospitalar. Para tal foi determinado o grau de contaminação dos materiais/equipamentos amostrados. Com exceção dos resultados obtidos em meio MacConkey na primeira amostragem, todas as amostras colhidas a partir da torneira donde foi isolada a estirpe de *P. aeruginosa* apresentaram um grau de contaminação alto. Todas as amostras colhidas nos locais onde foram isoladas estirpes de *Mycobacterium gordonae* apresentaram um grau de contaminação baixo. Contudo dado o baixo número de isolados ambientais das duas espécies não permite estabelecer uma relação de causalidade entre o grau de contaminação e a presença das estirpes oportunistas em estudo.

O terceiro objetivo pretendia determinar o perfil de resistência/multiresistência a antibióticos e relacionar com a persistência da (s) estirpe (s) na unidade hospitalar, no ambiente, ou em material clínico. Não foi determinado o perfil de sensibilidade aos antibióticos das estirpes de *Mycobacterium gordonae* uma vez que foram identificadas numa fase muito próxima da entrega deste trabalho e não foram identificadas estirpes clínicas, não permitindo assim a comparação. Assim, foi apenas determinado o perfil de

sensibilidade a antibióticos da estirpe de *P.aeruginosa* isolada no ambiente. Trata-se de uma estirpe multirresistente, aspeto que tem em comum com as estirpes clínicas. Apresenta um perfil de sensibilidade à colistina e resistência à amoxicilina/acido clavulamico, à ceftazidima e à ampicilina como a maioria das estirpes clínicas. Como já foi feita referência, a inexistência de alguns antibióticos no laboratório da FCTUC, não permitiu o seu teste na estirpe ambiental, não permitindo assim, fazer uma mais rigorosa comparação entre as estirpes clínicas e ambientais do ponto de vista de sensibilidade aos antibióticos. Pelo facto de se ter isolado apenas uma estirpe ambiental, também não é possível relacionar o perfil de resistência aos antibióticos com a sua persistência no ambiente ou equipamentos.

Relativamente ao quarto objetivo, ele pretendia relacionar a estrutura clonal das estirpes encontradas no hospital e das estirpes encontradas nos doentes. A estirpe encontrada no ambiente e as estirpes clinicas de *P.aeruginosa* foram tipadas e o padrão RAPD obtido foi comparado. A análise do padrão RAPD permitiu concluir que a estirpe ambiental apresenta um padrão muito diferente das estipes clínicas, permitindo afirmar que não existe relação clonal entre a estirpe ambiental e clínicas de *P.aeruginosa*. Contudo, observa-se um padrão semelhante entre duas estirpes clínicas indicando a sua possível origem clonal.

Pelo exposto, e ainda que para alguns de uma forma parcial, considera-se terem sido atingidos os objetivos a que o investigador se propôs, resultantes de uma inquietação que o acompanha na prática clínica e às quais este trabalho vem dar um contributo numa perspetiva de melhoria das suas práticas, mas também no intuito de dar um contributo para a formação dos pares e assistentes operacionais.

As IACS são um indicador da ausência de qualidade dos cuidados de saúde que urge atenuar. Não só pela morbilidade e mortalidade que lhes estão associados, com a consequente ausência de produtividade das pessoas que sofrem das suas consequências, mas sobretudo porque associado às IACS vem o aumento dos custos com o tempo de internamento, com terapêutica e exames complementares de diagnóstico, para além das repercussões familiares e sociais que motivam processos de transição muitas vezes complexos.

A prevenção assume assim, um papel preponderante no controlo da infeção, surgindo como uma estratégia concertada para fazer face a esta problemática em que os estados através dos seus ministérios procuram colocar em prática uma série de diretrizes emanadas pela organização mundial de saúde. Portugal neste sentido implementou o PNCI e criou as CCI's que são responsáveis pela sua operacionalização em contexto das instituições hospitalares.

Um ambiente seguro do ponto de vista microbiológico concorre para os aspetos que se relacionam com a segurança do doente, mas também dos profissionais. Para o doente, na medida em a prevenção das IACS, diminui o tempo de internamento, dos custos e da taxa de morbilidade e mortalidades que lhes estão associados. Para os profissionais, exercer a sua atividade num ambiente seguro, contribui para uma baixa taxa de absentismo por doença, com a diminuição de produtividade e qualidade de vida que daí advém.

O Enfermeiro enquanto profissional de saúde desempenha um papel fundamental na prevenção das IACS, pelo facto de ser o profissional que mais tempo passa junto do doente, mas também pelo papel que desempenha, conduzindo-o a ser um garante da segurança do doente. Neste âmbito é-lhe pedido que desempenhe um papel cada vez mais relevante na investigação e na área da vigilância epidemiológica desta problemática.

Aspetos que vêm ao encontro das Competências Específicas do Enfermeiro Especialista em Enfermagem em Pessoa em Situação Crítica, definidas no regulamento n.º 124/2011, do Diário da república, 2ª Série de 18/02/2011, nomeadamente a competência K3, que refere que o enfermeiro "Maximiza a intervenção na prevenção e controlo da infeção perante a pessoa em situação crítica e ou falência orgânica, face à complexidade da situação e à necessidade de respostas em tempo útil e adequadas" (Portugal 2011,p. 8657).

O enfermeiro em geral e o enfermeiro especialista em particular, desempenham um papel importante no âmbito da formação dos pares para a prevenção e controlo da infeção e na gestão das práticas de cuidados, nomeadamente nas que se relacionam com a segurança dos cuidados de enfermagem. Estando os assistentes operacionais, responsáveis pela higienização das superfícies e dos equipamentos hospitalares, cabe ao enfermeiro especialista que desempenha funções supervisas sobre estes profissionais, supervisionar a aplicação por parte destes, de normas e recomendações sobre a higienização de materiais e superfícies hospitalares e por uma correta aplicação da política de uso de detergentes e antisséticos. Cabe ainda ao enfermeiro especialista fazer formação, não só para dar a conhecer novas normas e recomendações institucionais mas também quando verifica um deficit de conhecimentos no seio da equipa multidisciplinar.

Neste contexto, este trabalho trará benefícios para os serviços, para a instituição, para a prática de cuidados e ainda para aspetos que se relacionam com a gestão.

Para os serviços onde este estudo se desenvolveu, pois permite identificar locais e equipamentos que não têm sido alvo de uma correta higienização, ou que mesmo que feita adequadamente, a sua detioração fazem deles um ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos com potencial patogénico. Como exemplo, pode-se referir os chuveiros que apresentam um grau de contaminação alto, mas quando substituídos, esse grau de contaminação baixa sendo recuperado nas amostras lá colhidas, um número muito reduzido de colónias.

Para a instituição onde este estudo foi efetuado, este trabalho permitirá ter uma perceção dos equipamentos e locais biologicamente inseguros para os doentes e profissionais. Permite à CCI, como órgão que depende do CA da instituição, identificar aspetos onde deve incidir a sua ação, nomeadamente no estabelecimento de normas para a manutenção de torneiras e chuveiros, pois são nitidamente os locais mais problemáticos em termos de foco de contaminação. Permite ainda manter o enfoque em aspetos que se prendem com a higienização das mãos por parte dos profissionais, pois sendo um aspeto onde tem sido feito um grande investimento no que toca a adesão dos profissionais a este ato, continuam a existir lacunas, comprovado pela existência, no mesmo serviço, de um microrganismo num carro de terapêutica e na pega de cabeceira com provável origem clonal.

Para a prática de cuidados na medida em que permite perceber quais os microrganismos potencialmente patogénicos presentes no ambiente e a sua localização nos respetivos equipamentos de uso clínico. Alerta assim os profissionais para a necessidade de uma melhor limpeza e desinfeção destes, e uma higienização das mãos de forma mais sistemática e cuidada.

Para a gestão poderá também acarretar aspetos positivos, na medida em que identifica equipamentos e superfícies que necessitam de uma melhor higienização/desinfeção. Permite ao enfermeiro chefe dos respetivos serviços ter mais argumentos para solicitar a substituição de alguns equipamentos quando deteriorados ou solicitar a sua manutenção por profissionais especializados. Permite ainda identificar se os antisséticos utilizados, se de forma correta, estão a ser eficazes ou se haverá a necessidade da utilização de outros, com outros princípios ativos ou em concentrações diferentes daquelas em uso.

Decorrente das limitações deste estudo, acredita-se que a sua continuidade permitirá obter dados mais pormenorizados sobre o grau de contaminação dos materiais de uso clínico sobre a persistência de determinados microrganismos no ambiente, nomeadamente os microrganismos em estudo. Abre portas também ao desenvolvimento de novos projetos de investigação, nomeadamente no que diz respeito

à problemática das infeções provocadas por estirpes multirresistentes de *Klebsiella* na instituição hospitalar onde decorreu o estudo.

A identificação de bactérias com uma baixa percentagem de semelhança com a estirpe tipo, poderá ser também uma porta que se abre à investigação, no sentido da confirmação de tratar-se de bactérias novas com consequentes estudos necessários à sua classificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEG, Patricia Terron Ghezzi M.; SILVA, Ligiane de Lourdes – **Controle de Infecção Hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva: um estudo retrospectivo.** Revista Semina. Londrina. DOI: 10.5433/1679-0367.2011. Vol.32,nº1 (2011), p.47 - 58.

ABREU, Pedro M. de; SANTOS, Susana; PAIVA, Gabriel; ALMEIDA, Ana; MORAIS, Paula V. – **Ocurrence of Environmental *Pseudomonas aeruginosa* and other associated species in Hospital de Faro, Portugal**. **Microbiotec 11 /Health Microbiology and Biotechnology Posters** [em linha]. Braga, 2011. [consult. 15 de mar. de 2012]. Disponível em: http://microbiotec11.files.wordpress.com/2011/12/e-microbiotec11.pdf.

ALMEIDA, Margarete T.G.; BERTELLI, Érika C.P.; ROSSIT, Andréa R.B.; BERTOLLO, Eny M.G., MARTINEZ, Mariana B. **Infecções Hospitalares por Stenotrophomonas maltophilia: aspetos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana** [em linha]. 2005. [consult. 16 de Fev. de 2013]. Disponível emhttp://www.cienciasdasaude.famerp.br/racs_ol/vol-12-3/04%20-%20ID129.pdf.

ALVES, Artur; ISABEL, Henriques; SANTOS, Ana; TACÃO, Marta; CORREIA, António - **Tipagem Genética de Microrganismos.** Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro [em linha]. 2003. [consult. 16 de Fev. de 2012]. Disponível em: http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf

ALVES, M. S.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. - **A case of severe pancreatitis complicated by Raoultella planticula infection.** Journal of Medical Microbiology. Vol.56, (2007), P.696–698.

ASIJA, A.; PRASAD, A.; ESKRIDJE, E. - **Disseminated Mycobacterium gordonae infection in an immunocompetent host.** American Journal of Therapeutics. DOI: 10.1097/MJT.0b013e3181e32e55. Vol.18, nº3 (2011),p. 75-77.

AUMERAN, C.; PAILLARD, C.; ROBIN, F.; KANOLD, J., BAUD, O.; BONNET, R.; SOUWEINE,B.; TRAORE,O. - ***Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* Outbreak Associated With Contaminated Water Outlets in an Oncohaematology Paediatric Unit.** The Journal of Hospital Infection. Vol.65,nº1 (2007), p.47-53.

BEN-DOV, Eitan; SHAPIRO,Orr H.; SIBONI, Nachshon; KUSHMARO, Ariel - **Advantage of Using Inosine at the 3 Termini of 16S rRNA Gene Universal Primers for the Study of Microbial Diversity.** Applied and Environmental Microbiology. DOI: 10.1128/AEM.00849-06. Vol.72, nº11 (2006), p. 6902 – 6906.

BROOKE, Joanna S.- **Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen.** Clinical Microbiology Reviews. DOI: 10.11.1128/CMR.00019-11. Vol.25,nº1 (2012),p.2-41.

CAETANO, Joselany Afio ; LIMA, Maria Alzete; MIRANDA, Maira DiCiero; SERUFO, José Carlos; PONTE, Paulo Roberto Lins – **Identificação de Contaminação Bacteriana no Sabão Liquido de uso Hospitalar.** Revista da Escola de Enfermagem da USP. S. Paulo. Vol.45,nº1 (2011), p.153 – 160.

CHAVES, Fernando; GARCÍA-ÁLVAREZ, Mónica; SANZ, Francisca; ALBA, Concepción; OTERO, Joaquín R. **- Nosocomial Spread of a *Staphylococcus hominis*subsp. *novobiosepticus* Strain Causing Sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit.** Jornal of Clinical Microbiology. Vol.43,nº9 (2005) p.4877-4879.

D´AZEVEDO, Pedro A.; TRANCESI, Regina; TIAGO, Vendas de; MONTEIRO, Jussimara, GALES, Ana C., PIGNATARI, António C. – **Outbreak of *Staphylococcus hominis*subsp. *novobiosepticus* bloodstream infections in São Paulo city, Brazil.** Journal of Medical Microbioloy. Vol.57, nº2 (2008), p.256-257.

FILHO, Naomar de Almeida; ROUQUAYROL, Maria Zélia – Introdução à Epidemiologia. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 2006. 282 p. ISBN: 978-85-277-1187-6.

FORTIN, Marie-Fabienne – **Fundamentos e etapas do processo de Investigação**. Loures: Lusodidacta, 2006. 595p. ISBN: 978- 989-8075-18-5.

GAMBOA, Fernanda – **Infeções Respiratórias**: XXIX Jornadas de Atualização Pneumologica. COIMBRA: Gráfica de Coimbra, Lda, 2006.

GASPAR, Pedro João Soares [*et al*.] - Impacto da formação profissional contínua nos custos do tratamento das feridas crónicas**. Revista de Enfermagem Referência** - III - N.º 1 – 2010. ISSN: 08740283.

GOMES, Célia Margarida Alcobia - **A biologia molecular e os procariontes** [em linha]. 1998. [consult. 17 de Fevereiro de 2012]. Disponível em: http://www.co.it.pt/~emanuel/celia/bacteria.htm.

HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA – **Relatório Inquérito de Prevalência da Comissão de Controlo da Infeção Hospitalar.** Coimbra: 2010.

HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA – **Relatório Inquérito de Prevalência da Comissão de Controlo da Infeção Hospitalar.** Coimbra: 2012.

KLOOS, W.E.; GEORGE, C.G.; OLGIATE, J.S.; VAN PELT, L.; MCKINNON, M.L.; ZIMMER, B.L.; MULLER, E.; WEINSTEIN, M.P.; MIRRETT, S. **- Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures.** International Journal of Systematic Bacteriology. Nº 48 (1998) p.799-812.

LAI, Chih-Cheng; CHENG, Aristine, LIU, Wei-Lun; TAN, Che-Kim, HUANG,Yu-Tsung; CHUNG, Kuei-Pin; LEE, Meng-Rui; HSUEH, Po-Ren – **Infections Caused by Unusual Methylobacterium Species**. Journal of Clinical Microbiology. DOI:10.1128/JCM.01241-11. Vol. 49, nº9 (2011) p.3329-3331.

LEE, E.S.; LEE, Meu; HAN, S.H.; KA, J.O. - **Occurrence and Molecular Differentiation of Environmental Mycobacteria in Surface Waters.** Jounal of Microbilogy and Biotechnology. Vol. 18, nº 7 (2008) p. 1207-1215.

LEONI, E.; LEGNANI, P.; MUCCI, M.T.; PIRANI, R. - **Prevalence of Mycobacteria in a Swimming Pool Environment.** Journal of Applied Microbiology. Vol. 87 (1999), P.683–688.

LIMA, Márcia Valéria Rosa **– Condutas em Controlo de Infecção Hospitalar: Uma Abordagem Simplificada**. São Paulo: Iátria, 2007. 128p. ISBN: 978-85-7614-050-4.

MacFADDIN, Jean F. – **Media for Isolation- Cultivation- Identification – Maintenance of Medical Bacteria**. Volume I. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985.924 p. ISBN: 0-683-05316-7.

MIMS, Cedric, PLAYFAIR, John; ROITT, Ivan; WAKELIN, Derek, WILLIAMS, Rosamund. – **Microbiologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Manole Lda,1999. 584p. ISBN 85-204-0879-6.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Programa Nacional de Controlo de Infeção: Orientações Para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia** [em linha]. 2004. [consult. 12 de Fev. 2013]. Disponível em: http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde** [em linha]. 2007. [consult. 08 de Jan. 2012]. Disponível em: http://www.arslvt.min-saude.pt/SiteCollectionDocuments/SPublica/Controlo%20Infeccao/SP_ManualdeOperacionalizacao.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Inquérito Nacional de Prevalência de Infeção 2009** [Em linha]. 2009. [Consultado em 29 de Março de 2012]. Disponível em WWW: <URL http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i012628.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Relatório Inquérito de Prevalência de Infeção 2010** [em linha]. 2010. [consult. 27 de março 2013]. Disponível em: http://www.dgs.pt/ms/3/default.aspx?pl=&id=5514&acess=0.

MORAIS, P.V; MESQUITA, C.; ANDRADE, J.L.; COSTA, M.S. - **-Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant.** Appl Environ Microbiol. Vol.63, Nº 3 (1997), p.851-6.

MOREIRA, Leandra Ruzene Carlúcio - **Bancadas hospitalares: Superfícies e porosidades como fontes Potenciais de Infecção**. Tese de Mestrado, Universidade do Vale do Paraíba. [em linha]. 2002. [consult. 27 de março 2013]. Disponível em: http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000134.PDF.

MOTA, Sandra Patrícia Mendes da Silva - **Isolamento e Identificação Molecular de Micobactérias Não Tuberculosas.** Universidade de Aveiro. [em linha]. 2011. [consult. 15 de março 2012]. Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:LtAvwamf6JMJ:http://ria.ua.pt/bitstream/10773/7736/1/5819.pdf%2Baspecto+das+colonias+de+micobacterias&hl=pt-PT&gbv=2&gs_l=heirloomserp.3...289994.293299.0.295263.21.12.0.0.0.2.213.1253.0j9j1.10.0...0.0...1c.1.JB7w6FnoTXc&ct=clnk.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; KOBAYASHI, George S.; PFALLER, Michael A. – **Microbiologia Médica.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan sa, 2004.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; KOBAYASHI, George S.; PFALLER, Michael A. – **Microbiologia Médica.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Lda, 2006.ISBN 13- 978-85-352-1838-1.

NASSER, Yehia A.; ALY, Haifa, H.; AL-MOUSA, El Sayed M. Al Asar - **Nosocomial Infections in a Medical-Surgical Intensive Care Unit.** Med. Princ. Pract. DOI: 10.1159/000141500. vol.17 (2008) p.373 – 377.

NEOGEN - **R2A Agar (7390)** [em linha]. 2009. [consult. 1 de mar. 2013]. Disponível em: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7390_PI.pdf.

NEOGEN[a] - **Peptone water (7365)** [em linha]. 2010. [consult. 10 de Jan. 2013]. Disponível em: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7365_PI.pdf.

NEOGEN[b] - **LB Broth, Lennox (7290)** [em linha]. 2010. [consult. 10 de Jan. 2013]. Disponível em: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7290_PI.pdf.

NEOGEN[a] - **Mueller HInton Agar (7101)** [em linha]. 2011. [consult. 1 de Mar. 2013]. Disponível em: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7101_PI.pdf.

NEOGEN[b] - **Pseudomonas Isolation Agar (7329)** [em linha]. 2011. [consult. 1 de Mar. 2013]. Disponível em: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7329_PI.pdf.

NIELSEN,P. ;FRITZE,D.; PRIEST, F.G. - **Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species**. Microbiology. Vol.141 (1995) p.1745–1761.

OLIVEIRA, Cláudio; DANTAS, Valéria, NETO, Renato; AZEVEDO, Paulo; MELO,Maria – **frequência e Perfil de Resistência de *Klebsiella spp* em um Hospital Universitário de Natal/RN durante 10 Anos**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Vol. 47, n.º6 (2011), p.589-594.

PIRSON,M.; DRAMAIX, M. Struelens; RILEY, T.V.; LECLERCQ,P. – **Costs Associated With Hospital – acquired Bacteraemia in a Belgian hospital.** Journal of hospital infection. Vol .59, (2005) p.33 – 40.

POLIT, Denise F.; BECK,CherylTatano; HUNGLER, Bernadette P. – **Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem: Métodos, avaliação e utilização.** 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. ISBN 85-7307-984-3.

RADOMSKI, Nicolas; CAMBAU, Emmanuelle; MOULIN, Laurent, HAENN, Sophie; MOILLERON, Régis; LUCAS, Françoise S. - **Comparison of Culture Methods for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Surface Waters.** Applied and Environmental Microbiology. DOI:10.1128/AEM.02659-09. Vol. 76, Nº. 11 (2010), p. 3514 – 3520.

REGULAMENTO Nº 124/2011. **D.R. 2ª Série.** 35 (18/02/2011). [em linha]. Fevereiro de 2011,p.8656-8657 [consultado 8 maio. 2012]. Disponível em: http://dre.pt/pdf2sdip/2011/02/035000000/0865608657.pdf

RENDON, E. Fernandez; CORTES, J.F. Cerna; MEDINA, M.A. Ramirez; REPETTO, A.C. Helguera; RIVERA, S. Gutierrez; GARCIA, T. Estrada; MERCHAND, J.A. Gonzalez - **Mycobacterium Mucogenicum and Other Non-Tuberculous Mycobacteria in Potable Water of a Trauma Hospital: a Potential Source for Human Infection.** Journal of Hospital Infection. Vol.80 (2012) p. 74-76.

SOUSA, Paulo; UVA, António de Sousa; SERRALHEIRA, Florentino; LEITE, Ema; NUNES, Carla – **Segurança do doente: eventos adversos em hospitais portugueses. Escola Nacional de Saúde Publica. 1ª** ed. Lisboa: Personal Vision, 2011. 36 P. ISBN 978-989-97342-0-3.

TAKEUCHI, Fumihiko; WATANABE, Shinya; BABA,Tadashi; YUZAWA, Harumi; ITO, Teruyo; KURODA, Makoto; LONGZHU, Cui; TAKAHASHI, Mikio; ANKAI, Akiho; BABA, Shin-ichi; FUKAI, Shigehiro; LEE, Jean C.; HIRAMATSU, Keiichi - **Whole-Genome Sequencing of Staphylococcus haemolyticus Uncovers the Extreme Plasticity of Its Genome and the Evolution of Human-Colonizing Staphylococcal Species.** Journal of Bacteriology. Vol.187, nº 21 (2005), p.7292-7308.

TEIXEIRA, Andrey Borges – **Manual da Aula Prática de Eletroforese de DNA** [em linha]. 2003 [consult. 16 março 2013]. Disponível em: http://pt.scribd.com/doc/22101868/Manual-de-Eletroforese.

TIAGO, Igor; PIRES, Carlos; MENDES , Vítor; MORAIS, P.V.; COSTA, Milton S.; VERISSIMO, António - **Bacillus foraminis sp. nov., isolated from a non-saline alkaline groundwater.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. DOI 10.1099/ijs.0.64281-0. Vol.56 (2006), p.2571–2574.

UNITED NATIONS - **Recommendations on the transport of dangerous goods.** Volume I. Thirteenth revised edition. New York and Geneva [em linha]. 2003. [consult.

08 de Out.. 2012]. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev13/English/00E_Intro.pdf.

VIJAYARAGHAVAN, R.; CHANDRASHEKHR, R.; SUJATHA, Y.;BELAGAVI, C.C.- **Hospital outbreak of atypical micobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery**. ELSEVIER : Journal of Hospital Infection. N.º 64 (2006) p.344 – 347.

VOSAHLIKOVA, Sarca ; DREVINEK, Pavel ; CINEK,Ondrej; POHUNEK, Petr; MAIXNEROVA, Martina; URBASKOVA, Pavla; J.K. VAN DEN REIJDEN, Tanny; DIJKSHOORN, Lenie; NEMEC, Alexandr - **High genotypic diversity of Pseudomonas aeruginosa strainsisolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic.** Research in Microbiology. Vol.158 (2007) p.324 a 329.

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo de extração de DNA

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE ADN

1- Colocar de 100 ul de lisozima num *eppendorf*® de 1,5 ml

2- Adição de uma hansa de bactérias

3- Colocação da solução em água quente durante a noite

Manhã seguinte

4-Adicionar 500 ul de GES, á temperatura ambiente á solução anterior

5-Agitar

6-Aguardar 10 minutos

7-Adicionar 250 ul de acetado de amónio (previamente colocado em gelo

8-Agitar

9-Aguardar 10 minutos

10-Adicionar 500 ul de clorofórmio-isomilico, preparado numa proporção de 24:1

11-*Vortex* rápido

12-Centrifugar 15 minutos á velocidade máxima

13-Retirar sobrenadante para novo ependorfe de 1,5 ml

14-Repetir os passos de 10 a 13, 3 vezes

15-Colocar 600ul de isopropanol

16-Inverter *eppendorf*® 2/3 vezes

17-Centrifugar 15 minutos á velocidade máxima

18-Verter *eppendorf*®

19-Secar em papel

20-Adicionar 500 ul de etanol a 70%

21-Centrifugar 15 minutos á velocidade máxima

22-Verter *eppendorf*®

23-Colocar na estufa a 70ºC durante 10 minutos

24-Adicionar 30 ul de água estéril

25-Deixar hidratar durante a noite

26-Congelar a -20ºC para posterior sequenciação

ANEXO II

Autorização do Conselho de Administração do Centro hospitalar e Universitário de Coimbra

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.
Unidade de Inovação e Desenvolvimento
Centro de Ensaios Clínicos

AUTORIZAÇÃO DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

CHUC	92	12

NOME DO PROJECTO:

ESTUDO DA PREVALÊNCIA E DA VARIABILIDADE GENÁTICA DE ESTIRPES DE KLEBSIELLA SP. PSEUDOMONAS AERUGINOSA E DE MYCROBACTERIUM SP. EM AMBIENTE HOSPITALAR

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr.ª Paula Vasconcelos Morais

De acordo com a Legislação em vigor, é autorizada a realização, nos Hospitais da Universidade de Coimbra, do Projecto de Investigação supracitado.

DATA: 31 / 10 / 12

Presidente do Conselho de Administração

Dr. José Martins Nunes
Presidente do Conselho de Administração
C.H.U.C. - EPE

(Dr. José Martins Nunes)

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. 14.9.13

Unidade de Inovação e Desenvolvimento
Centro de Ensaios Clínicos

C.H.U.C. - EPE - Conselho de Administração
Autorizado.
2012.10.25

Exm.º Senhor

Presidente do Conselho de Administração

dos H.U.C.

Dr. José Martins Nunes
Presidente do Conselho de Administração
C.H.U.C. - EPE

12/10/2012

Ref.ª: **CHUC-92-12**

A pedido da ***Sr.ª Dr.ª Paula Vasconcelos Morais,*** recebeu esta Unidade um pedido de autorização de um Projecto de Investigação sobre "ESTUDO DA PREVALÊNCIA E DA VARIABILIDADE GENÁTICA DE ESTIRPES DE KLEBSIELLA SP. PSEUDOMONAS AERUGINOSA E DE MYCROBACTERIUM SP. EM AMBIENTE HOSPITALAR", ao qual não se aplicam as normas previstas na Lei n.º 46/2004 de 19 de Agosto e colheu parecer favorável da Comissão de Ética deste Hospital.

Informa-se V. Exª. que este projecto não acarreta qualquer encargo financeiro adicional para o CHUC.

Solicita-se assim a autorização do Conselho de Administração para este Projecto.

Com os mais respeitosos cumprimentos,

O Director da Unidade de Inovação e Desenvolvimento

(Prof. Doutor Pedro Monteiro)

C.H.U.C. - EPE
CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO
Reg. Nº 5227 PCA
Origem
Data 28/10/2012

☎ Secretariado - 239 400400 Ext. 13724 Telf. Directo: 239400477
Fax: 239832241; E-mail: gai@huc.min-saude.pt

ANEXO III

Autorização dos Diretores dos Serviços

CENTRO HOSPITALAR E UNIVERSITÁRIO DE COIMBRA, E.P.E.

HUC
HOSPITAIS
DA UNIVERSIDADE
DE COIMBRA

Serviço de Urologia e
Transplantação Renal
Dir.: Prof. Doutor Alfredo

Exmª Senhora
Profª Doutora Paula Vasconcelos Morais
Departamento de Ciências da Vida da
FCTUC

Coimbra, 14 de Setembro, 2012

Assunto:***Estudo da prevalência e variabilidade genética de estirrpes de Klebsiella sp. Pseudomonas aeruginosa e de Mycobacterium sp. em ambiente hospitalar***

Aceitamos com gosto, participar no Projecto a ser desenvolvido pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – Estudo da prevalência e variabilidade genética de estirrpes de Klebsiella sp. Pseudomonas aeruginosa e de Mycobacterium sp. em ambiente hospitalar

Com os melhores cumprimentos

Pel'O Diretor de Serviço

Dr. Francisco Rolo
Chefe de Serviço de Urologia

HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA

Directora: Dr.ª Adriana Teixeira

ASSISTENTES GRADUADOS
Ana Isabel Crisóstomo
Emília Magalhães
Carlos José Moucho
Paulo José Freitas Tavares
Sérgio Dinis Almeida Jesus
José A. Brás da Luz

ASSISTENTE HOSPITALAR
Marília Gomes
Emília Nobre Cortesão
Catarina Geraldes
Luis Carlos Rito

INTERNOS COMPLEMENTAR
Patrícia Sousa
Patrícia Olim
José Pedro Carda
Marta Isabel Pereira
Paula César
Raquel Guilherme
Sofia Bernardo Ramos
Mónica Santos
Rita Mendes Silva
Rita Tenreiro

ENFERMEIRA CHEFE
Helena Fernandes

DECLARAÇÃO

Declaro que vemos com bom grado que o ***"Estudo da prevalência e da variabilidade genética de estirpes de Klebsiella sp. Pseudomonas aeruginosa e de Mycobacterium sp. em ambiente hospitalar"*** decorra no Serviço de Hematologia Clínica.

É um assunto que nos interessa e cujos resultados podem-nos ser úteis no planeamento do combate às infecções nosocomiais do serviço que tanto nos preocupam.

Drª Adriana Teixeira

Coimbra, 13 de Setembro de 2012

Serviço de Hematologia Clínica
Praceta Mota Pinto
3000-075 Coimbra

00.351.239.400. 430
00.351.239.828. 807
hematologia@huc.min-saude.pt
helenam@huc.min-saude.pt

www.hematologiahuc.com

HUC HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

SERVIÇO DE MEDICINA INTERNA
Director: Prof. Doutor José Manuel Nascimento Costa

Exma. Senhora
Prof. Doutora Paula Vasconcelos Morais
Departamento de Ciências da Vida
FCTUC

Coimbra, 21 Junho 2012

Cara colega:

Aceitamos, com gosto, participar no Projecto a ser desenvolvido pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – avaliação da colonização dos equipamentos por estirpes de *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* aeruginosa e *Mycobacterium* não tuberculosas.

Com os melhores cumprimentos,

Prof. Doutor Nascimento Costa
Director do Serviço de Medicina Interna

Avª Bissaya Barreto e Praceta Prof. Mota Pinto – 3000-075 COIMBRA /// Telef. 239 400 439 FAX: 239 401 045

ANEXO IV

Autorização da Unidade de Investigação e Desenvolvimento e da Comissão de Ética

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.

COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE

Visto / À U.I.D.
para difusão
Prof. Doutor José Pedro Figueiredo
Director Clínico
C.H.U.C. - EPE

Exmo. Senhor:
Director Clínico do
CHUC, E.P.E.

N/Refª	Ofício Nº	Data
CES	0158	03.10.2012

ASSUNTO: [CHUC-92-12] – *Estudo observacional "Estudo da prevalência e variabilidade genética de estirpes de Klebsilella sp. Pseudomonas aeruginosa e de Mycobacterium sp. não tuberculosas em ambiente hospitalar"* – Paula Vasconcelos Morais – Professora Auxiliar do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra (estudo a ser realizado no Serviço de Patologia Clínica do HUC-CHUC).

Cumpre-me informar Vossa Ex.ª que a Comissão de Ética para a Saúde do CHUC, EPE, reunida em 28 de Setembro de 2012, com a presença da maioria dos seus membros, após análise do projecto mencionado em epígrafe e ouvido o relator, emitiu **parecer favorável** à sua realização. Deliberação aprovada por unanimidade.

O estudo tem como objectivos: 1) Avaliar a presença de estirpes de *Klebsilella* sp., *Ps. aerugionosa* e de *Mycobacterium* sp. em equipamentos e espaços hospitalares; 2) Relacionar a presença das estirpes referidas com o nível de contaminação microbiológica dos equipamentos (camas, cortinados, mesas, suportes de soros, lavatórios, duches, torneiras, bancadas e lavatório da sala de enfermagem, carros da terapêutica, tabuleiros); 3) Verificar a presença de outras espécies microbianas associadas; 4) Identificar os isolados ambientais e os obtidos de doentes dos serviços em estudo por sequenciação de gene rRNA16S e tipar geneticamente pelo seu padrão RAPD e Pulse-Field; 5) Relacionar o perfil de resistência/multiresistência a antibióticos com a persistência e/ou com a capacidade de disseminação; 6) Reconhecer os factores que promovam a disseminação/persistência das estirpes.

A investigadora pretende recolher amostras em diferentes superfícies de equipamento e instalações hospitalares para estudar as estirpes eventualmente existentes.
Pretende também fazer estudos comparativos com as estirpes identificadas em colheitas

Av. Bissaya Barreto / Pct.ª Prof. Mota Pinto
3000-075 Coimbra
E-mail: secetica@huc.min-saude.pt Tel.: 239 400 408 Fax: 239 405 646

realizadas em doentes. Estas colheitas foram anteriormente realizadas no âmbito do tratamento normal aos respectivos doentes e apenas os dados existentes no laboratório de microbiologia serão tratados, conforme a investigadora descreve no projecto "*No âmbito dos procedimentos clínicos, os médicos pedem análises para diagnóstico. As amostras têm origem nos três serviços em estudo e serão processadas no laboratório de microbiologia do hospital. As estirpes dos doentes (obtidas em consequência dos pedidos clínicos e não de pedidos extra) serão recolhidas pelos investigadores do projecto no laboratório de microbiologia dos CHUC. Prevê-se a existência de amostras positivas.*"

Mais se informa que a CES do CHUC deve ser semestralmente actualizada em relação ao desenvolvimento dos estudos favoravelmente analisados e informada da data da conclusão dos mesmos, que deverá ser acompanhada de relatório final.

Com os melhores cumprimentos,

P´A COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE
DO CHUC, E.P.E.

Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros
Presidente da CES do HUC - CHUC

Comissão de Ética para a Saúde

A CES do HUC-CHUC: Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros; Prof.ª Doutora Maria Fátima Pinto Saraiva Martins; Dr. Mário Rui Almeida Branco; Enf.º Adélio Tinoco Mendes; Prof. Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro; Dra. Alexandra Vilela; Padre José António Afonso Pais.
A CES do HSC-CHUC: Dra. Cláudia Santos; Dra. Conceição Pascoal; Dra. Ana Maria Martins, Dr. Paulo Figueiredo; Enf.ª Fernanda Pereira.
A CES do HG-CHUC: Dra. Maria Alice Torcato; Dr. José Alves Grilo Gonçalves; Enf.º Fernando Mateus; Dra. Maria Helena Gomes; Dr. José António Pinheiro; Dra. Margarida Cunha Martins

Av. Bissaya Barreto / Pct.ª Prof. Mota Pinto
3000-075 Coimbra
E-mail: secetica@huc.min-saude.pt Tel.: 239 400 408 Fax: 239 405 646